

# Regulation der Typ III Sekretion bei *Salmonella enterica* serovar Typhimurium im Zellkulturmodell

**Master Thesis**

**Author(s):**

Müller, Andreas

**Publication date:**

2004

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005115000>

**Rights / license:**

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

Regulation der Typ III Sekretion  
bei *Salmonella enterica* serovar Typhimurium  
im Zellkulturmodell

**Diplomarbeit**

von

**Andreas Müller**

verfasst

am Institut für Mikrobiologie

der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich

in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt

betreut durch Siegfried Hapfelmeier

November 2003 bis Mai 2004

# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
3.1	Evolution und Nomenklatur der <i>Salmonella</i> spp.	5
3.2	Typ III Sekretionssysteme	7
3.3	<i>Salmonella</i> Pathogenitätsinseln (SPI) 1 und 2	9
3.4	Fragestellungen der vorliegenden Arbeit	12
3.4.1	SPI-1- und SPI-2 Aktivität	12
3.4.2	Induktion von SPI-1-abhängigen Prozessen	12
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
4.1	Verwendete Lösungen und Medien	14
4.2	Molekularbiologische Methoden	16
4.2.1	Isolation von Plasmid-DNA	16
4.2.2	Restriktionsverdau	16
4.2.3	Entfernung von 3'/5'-Überhängen nach Restriktionsverdau	16
4.2.4	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	16
4.2.5	Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	17
4.2.6	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	17
4.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten	17
4.2.8	Herstellung von elektrokompenten Bakterien	17
4.2.9	Elektroporation von Plasmid-DNA in elektrokompente Bakterien	17
4.2.10	Plasmidtransfer mittels Konjugation	18
4.2.11	Phagentransduktion	18
4.3	Biochemische Methoden	19
4.3.1	Western Blot Analyse	19
4.3.2	TCA-Fällung von Kulturüberständen	19
4.3.3	SDS-Polyacrylamidgele	20
4.3.4	$\beta$ -Galactosidaseaktivitätsmessung	20
4.3.5	$\beta$ -Galactosidaseaktivitätsmessung in Zellkulturinfektionsexperimenten	20
4.4	Konstruktion von Stämmen und Plasmiden	21
4.5	Anzuchtbedingungen für Bakterien	26
4.6	Anzuchtbedingungen für COS7-Zellen	27
4.7	Immobilisierung von Bakterien auf Glasoberflächen	28

4.8	Optimierung der Permeabilisierungsbedingungen für extrazelluläre Bakterien	28
4.9	Zellkulturinfektionsexperimente	29
4.9.1	Einfache Infektionsexperimente	29
4.9.2	Infektionsexperimente zur Untersuchung der zellkontaktabhängigen SipA-Sekretion	29
4.9.3	Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung ohne Lysozymverdau	29
4.9.4	Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung mit Lysozymverdau	30
4.9.5	Immunfluoreszenzmikroskopie	30
<b>5</b>	<b>Resultate</b>	<b>32</b>
5.1	Aktivitäten von SPI-1 und SPI-2	32
5.1.1	* Zeitlicher Verlauf von SipA-Sekretion und SPI-2-Induktion	32
5.1.2	Charakterisierung des $p_{ssaG}$ -GFP-Reporterkonstrukts	37
5.2	Wirtszellkontakt und SPI-1-abhängige Prozesse	42
5.2.1	* Zusammenhang von SipA-Sekretion und Invasion	42
5.2.2	Permeabilisierung der bakteriellen Zellwand	44
5.2.3	Heterogenität von SPI-1-induzierten Bakterienkulturen	47
5.2.4	Wirtszellkontaktabhängige Translokation von SipA	52
5.2.5	Untersuchung des Einflusses von Wirtszellen auf die <i>sipA</i> -Geninduktion	58
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>61</b>
6.1	Aktivitäten von SPI-1 und SPI-2	61
6.2	Wirtszellkontakt und SPI-1-abhängige Prozesse	63
<b>7</b>	<b>Verwendete Abkürzungen</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>Dank</b>	<b>74</b>

## 2 Zusammenfassung

Das fakultativ intrazelluläre Bakterium *Salmonella enterica* subspecies I serovar Typhimurium benutzt Typ III Sekretionssysteme, um eine Vielzahl verschiedener so genannter Effektorproteine ins Zytoplasma von eukaryotischen Zellen zu translozieren. Manche dieser Effektorproteine bewirken die Invasion der Bakterien in nicht phagozytierende Zellen und die Inflammation von infiziertem Gewebe. Andere ermöglichen den Bakterien, in phagozytierenden Zellen zu überleben und zu proliferieren.

*Salmonella enterica* subspecies I serovar Typhimurium besitzt zwei verschiedene Typ III Sekretionssysteme, welche auf zwei Pathogenitätsinseln, den so genannten *Salmonella* Pathogenitätsinseln 1 und 2 (SPI-1 und SPI-2) codiert sind. Das auf SPI-1 codierte Typ III Sekretionssystem scheint mit der Invasion der Bakterien zusammenzuhängen, während das auf SPI-2 codierte für das intrazelluläre Überleben essentiell ist.

Die Funktionen der durch Typ III Sekretionssysteme translozierten Effektorproteine sind Gegenstand intensiver Forschung. Die Frage, wie genau die Gene der Typ III Sekretionssysteme oder der Sekretionsvorgang selbst induziert werden, ist dabei noch unklar.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie die Sekretion des SPI-1-Effektorproteins SipA untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente weisen darauf hin, dass in den Bakterien eine vorproduzierte Menge an SipA vorliegt, die bei Kontakt mit der Wirtszelle innert Minuten in das Wirtszellzytoplasma transloziert wird. Dies ist das erste Mal, dass in *Salmonella* spp. eine derartige zellkontaktabhängige Induktion der Typ III Sekretion auf zellulärer Ebene gezeigt werden konnte.

Überdies wurde in Infektionsexperimenten über längere Zeiträume die Überlappung der Sekretion von SipA mit der Induktion der Expression des SPI-2 Typ III Sekretionssystems festgestellt. Diese Beobachtungen geben Hinweise darauf, dass das SPI-1 Typ III Sekretionssystem in Prozessen beteiligt sein könnte, welche über die Invasion hinausgehen.

## 3 Einleitung

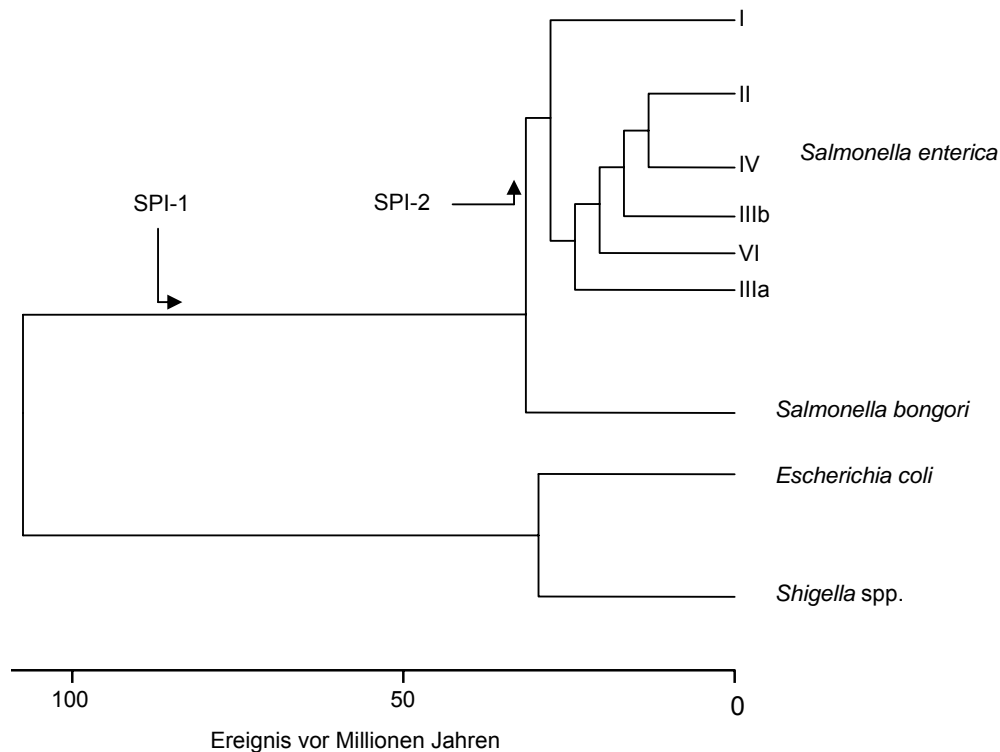
### 3.1 Evolution und Nomenklatur der *Salmonella* spp.

Die gram-negativen Bakterien des Genus *Salmonella* sind Krankheitserreger in verschiedensten Tieren, von Säugern über Vögel bis zu Reptilien. Die Klassifikation der *Salmonella* spp. beruhte früher auf der infizierten Wirtsspezies, der Variation von Oberflächenantigenen wie Lipopolysacchariden (O-Antigene) oder Flagellen (H-Antigene) nach dem so genannten Kauffman-White-Schema, und auf der Anfälligkeit auf bestimmte Phagen (welche wiederum oft von den Oberflächenantigenen abhängig ist). Diese Klassifizierung führte zu mehr als 2000 „Pathovaren“, „Serovaren“ und „Phagetypes“, welche meist nach Wirtsorganismus und Krankheitsbild (z.B. *Salmonella typhimurium* oder *Salmonella choleraesuis*) oder nach ihrer ersten Entdeckung (z.B. *Salmonella dublin*) benannt waren (Edwards, Olsen et al. 2002). Lange vor jeglichen Genomsequenzierungsprojekten war bereits bekannt, dass über 90% der DNA bei allen *Salmonellae* hoch homolog oder identisch ist (Crosa, Brenner et al. 1973). Trotz dieser engen Verwandtschaft haben die verschiedenen Spezies und Subspezies oft unterschiedliche Wirtsspezifitäten und sind Ursache verschiedenster Krankheitssymptome (Edwards, Olsen et al. 2002).

In den 1980er Jahren wurden die verschiedenen *Salmonella* spp. in einer einzigen Spezies *Salmonella enterica* zusammengefasst und die historischen Subgenera von *Salmonella* als Subspeziesbezeichnungen übernommen (Le Minor and Popoff 1987). Aufgrund von Ergebnissen von Multilocus-Enzymelektrophorese-Experimenten und Sequenzvergleichen der 16S rRNA und anderer Haushaltsgene wurde das Genus *Salmonella* später in zwei Spezies, *S. bongori* und *S. enterica*, unterteilt. Letztere umfasst die Subspezies I, II, IIIa, IIIb, IV, VI und VII, während *S. bongori* die frühere Subspezies V beinhaltet (Reeves, Evins et al. 1989; Boyd, Wang et al. 1996). Ein wichtiger Schritt in der Entwicklung zum Genus *Salmonella* war der Erhalt der so genannten *Salmonella* Pathogenitätsinsel 1 (SPI-1), welche beiden *Salmonella* spp. gemein ist. Dieser Virulenzfaktor ist essentiell für die Invasion in Epithelzellen und ist somit der Grundstein für die Virulenz der *Salmonella* spp.

*S. enterica* unterscheidet sich in erster Linie bezüglich des Erwerbs einer weiteren Pathogenitätsinsel, SPI-2, von *S. bongori*. Beide Ereignisse sind vermutlich das Resultat von horizontalem Gentransfer. Abb. 1 zeigt die Zeitpunkte des Erwerbs von SPI-1 und SPI-2 im Laufe der Evolution von *Salmonella* in einem modellierten Stammbaum (Baumler 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden Stämme von *Salmonella enterica* subspecies I serovar Typhimurium verwendet, die im Folgenden der Einfachheit halber als *Salmonella* Typhimurium bezeichnet werden. *Salmonella* Typhimurium gehört zu den so genannten nicht-typhoiden *Salmonellae* und ist pro Jahr weltweit die Ursache von über einer Milliarde akuter Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts, von denen rund drei Millionen tödlich verlaufen (Pang, Bhutta et al. 1995). In Industrieländern sind *Salmonella* spp. die häufigsten Erreger von Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts und so vor allem von sozioökonomischer Bedeutung (Mead, Slutsker et al. 1999).



**Abb. 1** Modellierter Stammbaum der verschiedenen Spezies und Subspezies vom Genus *Salmonella* im Hinblick auf den Erhalt von Virulenzfaktoren durch horizontalen Gentransfer. Gezeigt ist ausserdem die relativ nahe Verwandtschaft zu *Escherichia coli* und *Shigella flexneri*. Verwendete Abkürzungen: SPI-1, *Salmonella* Pathogenitätsinsel 1; SPI-2, *Salmonella* Pathogenitätsinsel 2. Vereinfacht nach (Baumler 1997).

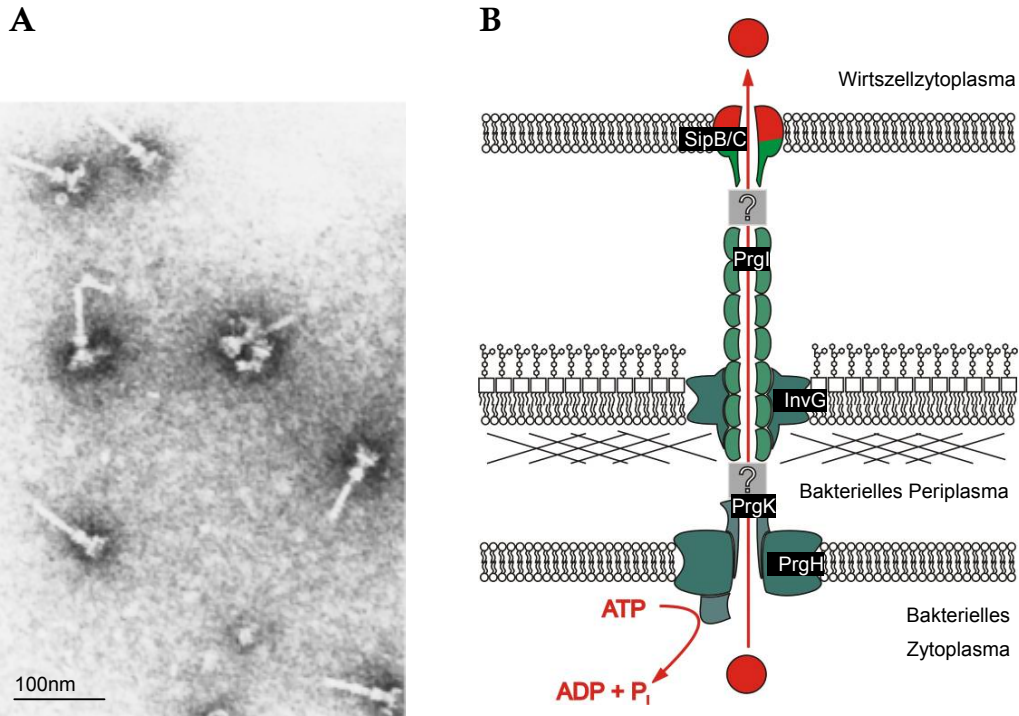
### 3.2 Typ III Sekretionssysteme

Typ III Sekretionssysteme (im Folgenden wird die englische Abkürzung TTSS, für „Type Three Secretion System“ verwendet) sind hochkomplexe Multiproteinapparate, die in vielen gram-negativen Bakterien vorkommen und den Bakterien ermöglichen, bestimmte Proteine ins Zytoplasma einer Wirtszelle zu translozieren (Cornelis and Van Gijsegem 2000) Abb. 2). *Salmonella* Typhimurium verfügt über zwei verschiedene TTSS, welche eine zentrale Rolle bei der Invasion in Wirtszellen und der nachfolgenden intrazellulären Proliferation spielen. Die Proteine der Sekretionsapparate sowie viele der translozierten Effektorproteine sind auf den *Salmonella* Pathogenitätsinseln 1 und 2 (SPI-1 bzw. SPI-2) codiert. Die TTSS von *Salmonella* Typhimurium translozieren verschiedene Effektorproteine aus dem Bakterium durch die Zytoplasmamembran der Wirtszelle in deren Zytosol (Abb. 2), wo durch spezifische Wechselwirkungen mit zellulären Komponenten Prozesse in Gang gesetzt werden, welche zur Aufnahme des Bakteriums in die Zelle führen und sein Überleben in der Wirtszelle sicherstellen (Tab. 1).

Typ III Sekretionssysteme zeichnen sich durch folgende Merkmale aus: Viele der translozierten Proteine benötigen zytosolische Chaperone; den durch ein TTSS translozierten Proteinen fehlt ein abspaltbares Signalpeptid, wie es bei Proteinen vorkommt, die über den allgemeinen Sekretionsweg transportiert werden; die Translokation über TTSS erfolgt wahrscheinlich in einem Schritt direkt durch alle Membranen, sprich, aus dem bakteriellen Zytoplasma ins Wirtszellzytoplasma. Dieser Transportweg wird im Gegensatz zur Sekretion ins umgebende Medium als Translokation bezeichnet. Schliesslich scheint bei den Typ III Sekretionssystemen mancher Spezies, anders als bei anderen Sekretionswegen, der Kontakt mit einer Wirtszellmembran nötig zu sein, um die Sekretion vollständig zu aktivieren (Galan and Collmer 1999).

Die supramolekulare Struktur der vermuteten Hauptkomponente von Typ III Sekretionssystemen, des so genannten Nadelkomplexes, wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht: Ungefähr 80nm lange röhrenförmige Strukturen (so genannte „Nadelkomplexe“) mit einem Durchmesser von ca. 13nm scheinen mit jeweils zwei ringförmigen Multiproteinkomplexen in innerer und äusserer Bakterienmembran verankert zu sein (Abb. 2). Die Architektur der Apparatkomponente in innerer und äusserer Membran ähnelt der Struktur des so genannten Basalkörpers der Flagellen (Kubori, Matsushima et al. 1998). Neben der strukturellen Ähnlichkeit zum basalen Teil von Flagellen findet man auch Sequenzhomologie zu Proteinen des Flagellenapparats. Dieser Befund lässt einen gemeinsamen stammesgeschichtlichen Ursprung beider Organellen vermuten (Minamino and Macnab 1999).





**Abb. 2** Struktur und Funktionsweise eines Typ III Sekretionssystems. **A:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von aufgereinigten Nadelkomplexen von *S. Typhimurium* (Kubori, Matsushima et al. 1998). **B:** Hypothetischer Aufbau und Funktionsweise des auf SPI-1 codierten Typ III Sekretionssystems. Einige der wichtigen Apparatkomponenten sind schwarz unterlegt beschriftet. Ein transloziertes Protein (rot) gelangt wahrscheinlich über die durch den Nadelkomplex gebildete Röhre des TTSS (grün) aus dem bakteriellen Zytoplasma in die Wirtszelle. Die Proteine SipB und SipC haben vermutlich eine doppelte Funktion: Sie inserieren in die Wirtszellmembran und bilden einen essentiellen Bestandteil des Translokationsapparats. Gleichzeitig wirken sie aber wohl auch im Zytosol der Wirtszelle als Effektorproteine (Vereinfacht nach (Kimbrough and Miller 2002)).

### 3.3 *Salmonella* Pathogenitätsinseln (SPI) 1 und 2

Bei einer oralen Infektion von Mäusen gelangt *Salmonella* Typhimurium vermutlich über das Darmepithel in den Körper. Die Pathogenität des Bakteriums korreliert mit der Fähigkeit, *in vitro* in Epithelzellen einzudringen (Galan and Curtiss 1989). Den Beginn der Invasion von *Salmonella* Typhimurium in Wirtszellen, beispielsweise Enterozyten oder M-Zellen, markieren ausgeprägte Membranolagerungen, so genannte „membrane ruffles“, welche die Bakterien bei Kontakt mit der Wirtszelle hervorrufen. Induktion dieser „membrane ruffles“ und die Invasion ist von dem auf SPI-1 codierten TTSS abhängig (Wallis and Galyov 2000). Effektorproteine, die durch dieses Sekretionssystem in die Wirtszelle injiziert werden, bewirken durch Störung der intrazellulären Signaltransduktionswege oder durch direktes Binden an Zytoskelettkomponenten die Umstrukturierung von Actinfilamenten und so die Makropinozytose des Bakteriums durch die Wirtszelle (Zhou, Mooseker et al. 1999; Buchwald, Friebe et al. 2002). Diese Vorgänge sind mikroskopisch als Membranolagerungen beobachtbar. Gewisse SPI-1 Effektoren induzieren ausserdem bei infizierten Epithelzellen des Darms die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, was zur Einwanderung von polymorphonukleären Granulozyten (PMNs) führt (Lee, Silva et al. 2000). Andere SPI-1 Effektoren können über die Aktivierung von Caspase-1 in Makrophagen Apoptose auslösen (Hersh, Monack et al. 1999).

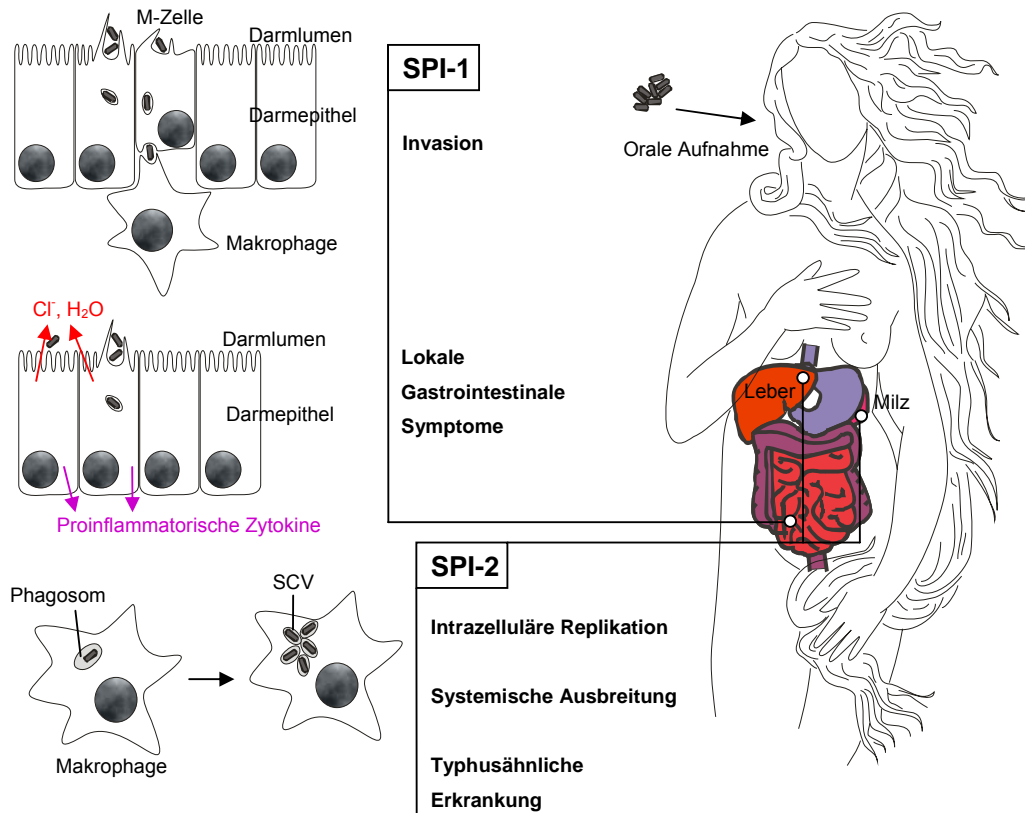
SipA, auf welches in der vorliegenden Arbeit im Besonderen eingegangen wurde, wird durch das auf SPI-1 codierte TTSS transloziert. Es scheint Actinfilamente, die durch die Aktivität anderer Effektorproteine (siehe Tab. 1) gebildet werden, zu stabilisieren (Phoebe Lostroh and Lee 2001). Diese Stabilisierung erfolgt durch Senken der so genannten kritischen Konzentration des globulären Actins, auf diesem Wege begünstigt SipA die Polymerisierung zu Actinfilamenten (Galkin, Orlova et al. 2002). Ferner führt eine direkte Bindung an Actinfilamente (Lilic, Galkin et al. 2003) zur Inhibition der Depolymerisierung derselben (McGhie, Hayward et al. 2004). SipA scheint aber zusätzlich in die proinflammatorischen Prozesse während einer Infektion durch *Salmonella* Typhimurium miteinbezogen zu sein (Lee, Silva et al. 2000; Hapfelmeier, Ehrbar et al. 2004).

Im weiteren Verlauf der Infektion spielt das auf SPI-2 codierte TTSS eine entscheidende Rolle. *Salmonella* Typhimurium vermehrt sich intrazellulär in so genannten „*Salmonella*-containing vacuoles“ (SCVs), deren Biogenese von SPI-2 abhängig ist: Durch Interferenz mit dem Vesikulärtransport der Wirtszelle wird erreicht, dass frühe lysosomale Proteine von der SCV-Membran ausgeschlossen bleiben, während diejenigen des späten Endozytosepathways selektiv angereichert werden (Waterman and Holden 2003): Die Fusion der SCV mit Lysosomen wird verhindert und das Bakterium entgeht so der Degradation (Uchiya, Barbieri et al. 1999). SPI-2 von *Salmonella* Typhimurium ist unerlässlich für die Entwicklung der systemischen Infektion in

Mäusen. Diese Infektion ist ein Modellsystem für Typhus, welcher beim Menschen durch *Salmonella enterica* subspecies I serovar Typhi verursacht wird (Hansen-Wester and Hensel 2001). Eine Zusammenfassung postulierter Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen ist schematisch in Abb. 3 dargestellt.

**Tab. 1** Übersicht über einige Effektorproteine, die über die beiden Typ III Sekretionssysteme von *Salmonella* Typhimurium transloziert werden. Die Tabelle erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit und beschränkt sich auf Effektoren, deren Funktion untersucht wurde oder die in der vorliegenden Arbeit erwähnt werden. Vereinfacht aus (Ehrbar, Mirolid et al. 2002; Waterman and Holden 2003).

Effektor	Transloziert über	(Vermutete) Funktion	Referenz
SipA	SPI-1-TTSS	Stabilisierung und Organisation von F-Actin während und nach dessen Polymerisation durch SipC	(Zhou, Mooseker et al. 1999; McGhie, Hayward et al. 2004)
SipB	SPI-1-TTSS	Induktion der Apoptose in Makrophagen, Beteiligung an Translokationsprozess	(Hersh, Monack et al. 1999)
SipC	SPI-1-TTSS	Actinpolymerisation und -organisation, Beteiligung an Translokationsprozess	(Hayward and Koronakis 1999; McGhie, Hayward et al. 2004)
SopB	SPI-1-TTSS	PI-Phosphatase	(Norris, Wilson et al. 1998)
SopE	SPI-1-TTSS	Guanosin-Nucleotid austauschfaktor für Rho-GTPasen	(Wood, Rosqvist et al. 1996; Hardt, Chen et al. 1998)
SopE2	SPI-1-TTSS	Guanosin-Nucleotid austauschfaktor für Rho-GTPasen	(Stender, Friebe et al. 2000)
SptP	SPI-1-TTSS	GTPase-aktivierendes Protein für Rho-GTPasen, Tyrosinphosphatase	(Kaniga, Uralil et al. 1996; Fu and Galan 1999)
SpiC	SPI-2-TTSS	Interferenz mit dem vesikulären Transport der Wirtszelle	(Uchiya, Barbieri et al. 1999)
SseG	SPI-2-TTSS	Beteiligung an der Bildung von durch <i>Salmonella</i> induzierten Filamenten (sif)	(Guy, Gonias et al. 2000; Kuhle and Hensel 2002)
SifA	SPI-2-TTSS	Membranintegrität der <i>Salmonella</i> -containing vacuole (SCV)	(Stein, Leung et al. 1996; Ruiz-Albert, Yu et al. 2002)
SseJ	SPI-2-TTSS	Acyltransferase, Kontrolle der Dynamik der SCV-Membran	(Ruiz-Albert, Yu et al. 2002; Freeman, Ohl et al. 2003)
SspH2	SPI-2-TTSS	Actin-Umorganisation	(Miao, Scherer et al. 1999)



**Abb. 3** Schema möglicher Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen während einer Infektion mit *Salmonella* beim Menschen (bzw. im entsprechenden Modell bei der Maus (Barthel, Hapfelmeier et al. 2003)). SPI-1 ist hierbei vor allem während früher Phasen der Infektion von Bedeutung, beispielsweise bei der Invasion in nicht phagozytierende Zellen und vermutlich auch bei der Durchdringung des Darmepithels. Ausserdem ist SPI-1 während der gastrointestinalen Erkrankung Auslöser für die Durchfallsymptome, indem es die Ausschüttung von Chloridionen ins Darmlumen induziert. Die Rolle von SPI-2 bei der humanen Infektion ist noch nicht vollständig geklärt. Dieser Teil der Abbildung fasst die Erkenntnisse aus dem „Mäusetyphus“-Modell (Mausinfektion durch *Salmonella* Typhimurium) zusammen. SPI-2 ist in späteren Stadien der Infektion für die systemische Ausbreitung des Bakteriums und die Kolonisation von Wirtsorganen wie Leber und Milz erforderlich. Die von SPI-2 vermittelte Fähigkeit zum Überleben und zur Replikation in phagozytischen Wirtszellen scheint dabei von grösster Bedeutung für diese Phase der Infektion zu sein. Das Phagosom, in das die Bakterien in phagozytischen Zellen gelangen, wird aufgrund der Wirkung von SPI-2 zu einem speziellen Kompartiment, der so genannten *Salmonella*-containing Vacuole (SCV) (Hansen-Wester and Hensel 2001).

## 3.4 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

### 3.4.1 SPI-1- und SPI-2 Aktivität

Das Verständnis der unter 3.3 besprochenen Prozesse geht zu einem grossen Teil auf *in vitro*-Infektionsexperimente an Epithelzelllinien zurück. Die zeitlichen Abläufe der Genexpression von SPI-1 und SPI-2 während der Infektion einer Wirtszelle mit *Salmonella* Typhimurium, beispielsweise die Frage, ob es eine mögliche gleichzeitige Genexpression von SPI-1 und SPI-2 gibt, sind noch nicht völlig aufgeklärt (Knodler and Steele-Mortimer 2003). Ausserdem ist noch nicht sicher, ob SPI-1 nicht auch eine zusätzliche Rolle bei Prozessen zugeschrieben werden muss, die über eine Beteiligung am Invasionsprozess hinausgeht. So sind beispielsweise SPI-1 Typ III-sekretionsdefiziente *Salmonella* Typhimurium offenbar nur eingeschränkt in der Lage, intrazellulär zu proliferieren (Steele-Mortimer, Brumell et al. 2002).

Dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit liegt deshalb die Frage zugrunde, ob über das SPI-1 TTSS translozierte Effektorproteine zu Zeitpunkten, zu denen SPI-2 codierte Gene schon exprimiert werden, noch in infizierten Zellen vorliegen können. In Zellkulturinfektionsexperimenten wurde deshalb der zeitliche Ablauf einer Infektion von COS7-Zellen mit *Salmonella* Typhimurium untersucht. Dabei wurden Sekretion und Lokalisierung des auf SPI-1 codierten Effektorproteins SipA mittels Immunfluoreszenzmikroskopie verfolgt. Parallel zur Färbung von SipA wurde die Induktion von Genen des SPI-2-Sekretionsapparats mit Hilfe eines Reporterkonstrukts analysiert.

Bei den durchgeführten Experimenten wurde beobachtet, dass SipA direkt nach der Infektion bis zu vier Stunden um die Bakterien nachweisbar war. Die Induktion des SPI-2 spezifischen GFP-Reporterkonstrukts war ab ein bis zwei Stunden nach Beginn der Infektion zu beobachten. Bei zwei bis vier Stunden nach Infektionsbeginn wurde aber ein Zeitfenster gefunden, in dem sowohl SPI-1- wie auch SPI-2-Aktivität nachweisbar waren. Es bleibt nun zu untersuchen, ob die Funktion von SipA über die Beteiligung an der Invasion der Bakterien hinausgeht.

### 3.4.2 Induktion von SPI-1-abhängigen Prozessen

Für die TTSS anderer Spezies wurde gezeigt, dass Proteintranslokation über TTSS oder gar die Induktion entsprechender Gene vom Kontakt mit der Wirtszellmembran abhängig sind: *Shigella flexneri* beispielsweise scheint grössere Mengen Effektorprotein im Zytoplasma zu akkumulieren und bei Kontakt mit der Wirtszelle oder Komponenten der extrazellulären Matrix ins umgebende Medium zu sekretieren (Menard, Sansonetti et al. 1994; Watarai, Tobe et al. 1995). Dagegen sind

in *Yersinia* spp. die Gene der über das TTSS translozierten Effektoren offenbar bis zum Wirtszellkontakt reprimiert. Die Effektoren werden dann nach Kontakt mit der Wirtszellmembran grösstenteils so gezielt ins Wirtszellzytoplasma transloziert, dass nur minimale Mengen ins umgebende Medium sekretiert werden (Persson, Nordfelth et al. 1995; Pettersson, Nordfelth et al. 1996).

Im Fall des SPI-1 TTSS in *Salmonella* spp. ist der Zusammenhang von Wirtszellkontakt und Proteintranslokation beziehungsweise Genexpression noch nicht verstanden (Hueck 1998; Cornelis and Van Gijsegem 2000). Biochemische Experimente gaben Hinweise auf die Abhängigkeit der Sekretion des Nadelkomplexproteins InvJ von lebenden Zellen oder fötalem Kälberserum (Zierler and Galan 1995). Eine spätere Arbeit identifizierte aber diesen Befund als Artefakt und lieferte Hinweise auf eine Sekretion, welche durch leicht sauren pH stärker induziert wurde als durch die Anwesenheit von Zellen, konnte aber eine zellkontaktabhängige verstärkte Sekretion nicht eindeutig ausschliessen (Daeﬂer 1999). Beide Arbeiten basieren auf Western Blot Analysen von Zellkulturüberständen und sedimentierten Bakterien; eine Sekretionsinduktion wurde noch nie auf zellulärer Ebene betrachtet.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde deshalb in Zellkulturinfektionsexperimenten ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Wirtszellmembrankontakt von *Salmonella* Typhimurium und der Translokation des Effektorproteins SipA untersucht. Dabei wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie die Sekretion des Effektorproteins aus den Bakterien verfolgt. Hierfür wurde ein Färbeprotokoll benötigt, das den Nachweis von Effektorproteinen im bakteriellen Zytoplasma erlaubt. Ein solches Protokoll wurde in der vorliegenden Arbeit etabliert: Es gelang, intrabakterielles SipA mittels Permeabilisation der bakteriellen Zellwand mit Lysozym für Immunfluoreszenzexperimente nachweisbar zu machen.

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass es für SipA zwei Transportgeschwindigkeiten gibt: In der Abwesenheit von Epithelzellen erfolgt die Sekretion mit einer Halbwertszeit von über einer Stunde. Kommen die Bakterien jedoch in Kontakt mit einer Wirtszelle, so erfolgt der Transport aus dem Bakterienzytoplasma in die Wirtszelle viel schneller und ist innert Minuten bereits vollständig abgeschlossen.

**Anmerkung:** Ein Teil der vorliegenden Resultate stammt aus meiner zwischen August und November 2003 angefertigten Semesterarbeit. Da aber wichtige Kontrollen und Experimente, die aus Beobachtungen während der Semesterarbeit resultierten, einen Teil der vorliegenden Diplomarbeit ausmachen, wurden der Vollständigkeit halber einige Resultate aus der Semesterarbeit noch einmal aufgeführt. Die entsprechenden Kapitel und Abbildungen sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Verwendete Lösungen und Medien

10x A-Medium	10.5g $K_2HPO_4$ , 4.5g $KH_2PO_4$ , 1g $(NH_4)_2SO_4$ , 0.5g Natriumcitrat*2H <sub>2</sub> O, ddH <sub>2</sub> O ad 100ml, sterilfiltrieren.
10x DNA-Ladepuffer	6.25g Ficoll, 0.05% Bromphenolblau, 0.05% Xylencyanol FF, ddH <sub>2</sub> O ad 25ml.
10x Casaminosäuren	10g Casaminosäuren (Bacto™ Casamino Acids, Becton Dickinson), ddH <sub>2</sub> O ad 100ml, sterilfiltrieren, nur Plastikgefäße verwenden.
EBU-Agar	10g Trypton (Oxoid), 5g Hefeextrakt (Oxoid), 5g NaCl, 2g Maltose, 2g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 15g Agar (Polysciences Inc.), ddH <sub>2</sub> O ad 1l, autoklavieren, je 500ml Zugabe von 20ml 12% $K_2HPO_4$ , 0.63ml 1% Evans Blue (Sigma-Aldrich), 1.25ml 1% Uranin-AP (AppliChem).
0.5 M EDTA pH 8	186.1g EDTA, 800ml ddH <sub>2</sub> O, pH mit 1M NaOH einstellen, ddH <sub>2</sub> O ad 1l, autoklavieren.
F-Medium	10ml 10x N-Salzlösung, 300µl 10mM $MgCl_2$ , 380µl 100% Glycerin, 1ml 10% Casaminosäuren, ddH <sub>2</sub> O ad 100ml, sterilfiltrieren, nur Plastikgefäße verwenden.
10x Laemmli-puffer	151g Tris, 940g Glycin, 50g SDS, ddH <sub>2</sub> O ad 5l.
LB (Luria-Bertani)	5g NaCl, 5g Hefeextrakt (Oxoid), 10g Trypton (Oxoid), ddH <sub>2</sub> O ad 1l, autoklavieren.
LB-Agar	15g Agar (Polysciences Inc.) auf 1l LB-Medium, autoklavieren.
LB 0.3 M NaCl	17.5g NaCl, 5g Hefeextrakt (Oxoid), 10g Trypton (Oxoid), ddH <sub>2</sub> O ad 1l, autoklavieren.
LPS-Permeabilisationspuffer	10ml 0.5M EDTA, 2ml 1M Tris pH 8, 0.18 g Glucose, 100µl TritonX 100, ddH <sub>2</sub> O ad 100ml, sterilfiltrieren.

---

Lysozym-Verdaupuffer	2ml 0.5M EDTA, 2.5ml 1M Tris pH 8, 0.18 g Glucose, ddH <sub>2</sub> O ad 100ml, sterilfiltrieren.
10x N-Salzlösung	149.1mg KCl, 396.4mg (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 34.9mg K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 54.4mg KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8.37g BisTris (Fluka), 30ml ddH <sub>2</sub> O, pH mit HCl auf 7 einstellen, ddH <sub>2</sub> O ad 40ml, sterilfiltrieren, nur Plastikgefäße verwenden.
10x PBS	(Phosphate Buffered Saline, für Immunfluoreszenzfärbungen) 80g NaCl, 2g KCl, 11.5g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O, 2.4g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , ddH <sub>2</sub> O ad 1l, autoklavieren.
5x Proteingelladepuffer	10ml 0.5M Tris pH 6.8, 1.54g Dithiothreitol, 2g SDS, 0.1g Bromphenolblau, 1.15 ml 87% Glycerol, ddH <sub>2</sub> O ad 20ml.
50x TAE	1210g Tris, 285.5ml Essigsäure, 500ml 0.5M EDTA pH 8, ddH <sub>2</sub> O ad 5l.
0.5M Tris pH 6.8	6.5g Tris Base, 40ml ddH <sub>2</sub> O, pH mit 1M HCl anpassen, ddH <sub>2</sub> O ad 100ml, autoklavieren.
1.5M Tris pH 8.8	91g Tris Base, 300ml ddH <sub>2</sub> O, pH mit 1M HCl anpassen, ddH <sub>2</sub> O ad 500ml, autoklavieren.
Western Transferpuffer	3.03g Tris Base, 14.4g Glycin, ddH <sub>2</sub> O ad 800ml, 200ml Methanol.
10x Z-Puffer	16.1g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O, 5.5g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O, 0.75g KCl, 0.25g MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O, 3.5ml β-Mercaptoethanol, ddH <sub>2</sub> O ad 100ml, sterilfiltrieren.



## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 Isolation von Plasmid-DNA

Für die Plasmidpräparation aus *Escherichia coli* wurde das GenElute™ Plasmid Mini/Midiprep Kit (Sigma-Aldrich) verwendet, für die Plasmidaufreinigung aus *Salmonella* Typhimurium das Plasmid Midi Kit (25) (Qiagen). Beide Kits basieren auf alkalischer Lyse der Bakterien mit anschließender Reinigung der Plasmid-DNA mittels Anionenaustauschchromatographie. Es wurden Übernachtskulturen in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika verwendet. Das Volumen der Kulturen lag je nach Kopienzahl des Plasmids bei Midi Kits zwischen 50 und 150ml, bei Mini Kits zwischen 2 und 5ml.

### 4.2.2 Restriktionsverdau

0.5mg der zu verdauenden DNA wurde mit ddH<sub>2</sub>O und 10x Restriktionspuffer auf 20-50µl verdünnt. Verdaut wurde mit 5-10U des Restriktionsenzym gemäss den Angaben des Herstellers.

### 4.2.3 Entfernung von 3'/5'-Überhängen nach Restriktionsverdau

Wenn ein DNA-Fragment ohne Überhang benötigt wurde, wurden 5'-Überhänge mit dem Klenow-Fragment (Grosses Fragment der DNA Polymerase I, Gibco) aufgefüllt; 3'-Überhänge wurden mit demselben Enzym abgedaut. Dazu wurde die Restriktionsendonuclease in der Restriktionsmischung nach dem Verdau gemäss Anleitung des Herstellers inaktiviert. Es wurden dNTPs (dATP/dTTP/dCTP/dGTP=1/1/1/1) zu einer Endkonzentration von 25µM zugegeben sowie 0.5-1U des Klenow-Fragments. Das Gemisch wurde für 15min inkubiert, für das Auffüllen von 5'-Überhängen bei 25°C, für den Abbau von 3'-Überhängen bei 37°C. Danach wurde das Klenow-Fragment für 10min bei 75°C inaktiviert.

### 4.2.4 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Religation von Vektor-DNA ohne Integration der Insert-DNA zu vermeiden, wurde die Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase aus dem Kälberdarm (Alkaline Phosphatase, from calf intestine, Roche) dephosphoryliert. Zu diesem Zweck wurden zur Restriktionsmischung 10-20U der Phosphatase gegeben und für 30min bei 37°C und für weitere 30min bei 56°C inkubiert.

#### **4.2.5 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten**

DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurden, falls nicht anderweitig erwähnt, 1% Agarosegele in TAE-Puffer mit 0.5µg/ml Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich) verwendet. Als Grössenstandard diente der GeneRuler™ Ladder Mix (MBI Fermentas).

#### **4.2.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Die Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit Gene Clean (Bio101 Gene clean Kit III) aufgereinigt (gemäss Angaben des Herstellers). Die DNA wurde dabei an 6µl einer Glasmilchsuspension gebunden und mit 12µl ddH<sub>2</sub>O eluiert, von der resultierenden Suspension konnten nach 5min Zentrifugation bei 10000\*g 10µl DNA in wässriger Lösung dekantiert werden.

#### **4.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die (aus Agarosegelen extrahierten) DNA-Fragmente wurden mit 5U T4 DNA Ligase (MBI Fermentas) unter Zugabe des entsprechenden Ligationspuffers (10x, MBI Fermentas) in einem 12.5µl-Ansatz während 6-12h bei 16°C ligiert. Von den erhaltenen Ligationsansätzen wurden jeweils 0.5-1µl zur Elektroporation verwendet.

#### **4.2.8 Herstellung von elektrokompenten Bakterien**

10ml einer Übernachtskultur mit entsprechendem Antibiotikum wurden zu 500ml frischem LB-Medium gegeben. Diese Kultur wurde bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0.6 bei 37°C unter schütteln kultiviert und danach für 30min auf Eis gekühlt. Die Bakterien wurden zuerst mit 200ml und danach zweimal mit 20ml eisgekühltem ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Dazu wurde jeweils bei 4°C und 4000\*g während 10min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in neuer Waschlösung resuspendiert. Danach wurden die Bakterien unter gleichen Zentrifugationsbedingungen zweimal mit 20ml eisgekühlter 10%-Glycerinlösung gewaschen. Das daraufhin abzentrifugierte Sediment wurde in 1ml 10%-Glycerinlösung resuspendiert. 80µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die elektrokompenten Bakterien wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

#### **4.2.9 Elektroporation von Plasmid-DNA in elektrokompente Bakterien**

Elektrokompente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 0.5-2µl DNA-Lösung (Plasmid-DNA oder Ligationsansatz) gemischt. Das Gemisch wurde in eine auf Eis vorgekühlte

Elektroporationsküvette (1mm Elektrodenabstand) gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 25µF, 200Ω und 1.8kV in einem Gene Pulser™ Elektroporationsgerät (BioRad). Nach erfolgter Transformation wurden die Bakterien mit 1ml LB-Medium aus der Elektroporationsküvette gewaschen und bei 37°C für 1h geschüttelt. Danach wurde die Bakteriensuspension für 5min bei 6000\*g zentrifugiert und das Sediment auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

#### **4.2.10 Plasmidtransfer mittels Konjugation**

Von Donor- und Akzeptorstamm wurde über 16h eine 3ml-Kultur mit entsprechenden Antibiotika kultiviert. Je 300µl der beiden Kulturen wurden zweimal mit 300µl LB-Medium ohne Antibiotika gewaschen (Zentrifugation bei 6000\*g, 5min), in 300µl LB-Medium resuspendiert, danach miteinander vereinigt, bei 6000\*g während 5min zentrifugiert und das Sediment in 20 µl LB-Medium resuspendiert. Die so erhaltene Suspension wurde auf einem ca. 4cm<sup>2</sup> grossen Bereich der Oberfläche einer LB-Agarplatte aufgetragen und für 6 bis 8h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Bakterien mit 2ml LB-Medium von der Agarplatte gewaschen und unverdünnt sowie in den Verdünnungen 1/10, 1/100 und 1/1000 auf LB-Agar ausplattiert. Diese Platten enthielten Antibiotika, welche nur das Wachstum der gewünschten Transkonjuganten erlaubten. Nach 12h Inkubation bei 37°C wurden pro Konjugationsansatz vier Klone (grosse Kolonien, da es sich bei den kleineren Kolonien mit grösserer Wahrscheinlichkeit um Donorklone mit neu erworbener Antibiotikaresistenz handelte) auf LB-Agar mit entsprechenden Antibiotika vereinzelt.

#### **4.2.11 Phagentransduktion**

Aus Bakterien mit der zu transduzierenden Mutation mit Resistenzmarker wurde zunächst ein P22-Phagenlysate hergestellt: Zu 1ml einer Übernachtskultur dieser Bakterien wurde 4-40µl Wildtyp-P22-Phagenlysate gegeben und das Gemisch nach kräftigem Schütteln bei 37°C während 15min ohne Agitation inkubiert. Es wurden 10ml LB-Medium zugegeben und die Kultur bei 37°C bis zur Lyse der Bakterien geschüttelt, mindestens aber für 6 Stunden. Zur Vervollständigung der Lyse wurden 100µl CHCl<sub>3</sub> zugegeben, das Gemisch bei 37°C während 15min geschüttelt und danach bei 10000\*g und 4°C während 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen 0.45µm-Filter sterilfiltriert und nach Zugabe von einem Tropfen CHCl<sub>3</sub> bei 4°C gelagert. Von diesem Phagenlysate wurden 3-33µl zu 100µl einer Übernachtskultur der Rezipientenbakterien gegeben. Dieses Gemisch wurde für 15min bei 37°C inkubiert und auf LB-Agar mit für den transduzierten Genomabschnitt selektiven Antibiotika ausplattiert. Erhaltene Klone wurden dreimal vereinzelt, einmal davon auf EBU-Agar, um aufgrund eines typischen blauen

Farbumschlags Phagenkontamination der transduzierten Bakterien oder die Bildung von Pseudolysogenen erkennen und ausschliessen zu können.

## 4.3 Biochemische Methoden

### 4.3.1 Western Blot Analyse

Um neu konstruierte Bakterienstämme auf die Expression und/oder Sekretion von M45-markierten Proteinen zu testen, wurden mit TCA-Fällung konzentrierte Kulturüberstände bzw. sedimentierte Bakterienkulturen analysiert. Das Sediment von 500µl SPI-1-induzierter Bakterienkultur wurden in 40-60µl Laemmli-Probenpuffer (1x) resuspendiert, während 5min in kochendem Wasser denaturiert und auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Die Proteine wurden nach erfolgter Elektrophorese (über Nacht, 10-11 mA) auf eine Nitrocellulosemembran (Protran® BA 85, Schleicher&Schuell) transferiert (Semidry, 2h, 300mA). Die Membran wurde für 1h mit 5% Magermilchpulver in PBS mit 0.1% Tween 20 (National Diagnostics) blockiert und danach für 1h mit dem primären Antikörper (in PBS, 0.1% Tween 20, 5% Magermilchpulver) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10min in PBS mit 0.1% Tween 20 wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper, einem HRP-Konjugat, für 30min inkubiert (in PBS, 0.1% Tween 20, 5% Magermilchpulver). Anschliessend wurde der Blot dreimal für 10min mit PBS mit 0.1% Tween 20 gewaschen und mit dem ECL-Kit (Amersham Biosciences) entwickelt. Die Antikörper wurden in den in Tab. 4 angegebenen Konzentrationen verwendet.

### 4.3.2 TCA-Fällung von Kulturüberständen

Für den Nachweis sekretierter Proteine wurden 1.5-2ml induzierter Bakterienkulturen (siehe 4.5) bei 4°C und 6000\*g für 10min zentrifugiert, das Sediment verworfen und der Überstand sterilfiltriert. Zur erhaltenen Lösung wurden 0.2 Volumina 100% Trichloressigsäure (TCA) gegeben und während 1h auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine wurden bei 4°C und 13000\*g während 20min abzentrifugiert. Zum erhaltenen Sediment wurden 50µl PBS, 20µl 1.5M Tris pH 8.8 sowie 1ml eiskaltes Aceton zugegeben. Nach Zentrifugation bei 4°C und 13000\*g während 10min wurde das Sediment mit 300µl eiskaltem Aceton gewaschen und danach getrocknet. Nach Lösen in 40-60µl Laemmli-Probenpuffer (1x) wurden die Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

### 4.3.3 SDS-Polyacrylamidgele

Proteine wurden nach Molekulargewicht mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt. Es wurden, soweit nicht anders aufgeführt, 160cm<sup>2</sup>-Gele (Dicke: 1.5mm) mit 10% Polyacrylamid (aus einer Stammlösung mit Acrylamid und Bisacrylamid in einem Verhältnis von 29:1) in einer Hoefer<sup>TM</sup> SE400 Vertical Unit (Pharmacia) verwendet. Die Sammelgele enthielten 4% Acrylamid. Alle Gele enthielten 0.4% SDS, welches beim Giessen als 20% Lösung zugegeben wurde. Als Molekulargewichtsstandard diente Prestained Protein Marker (broad range, New England Biolabs).

### 4.3.4 $\beta$ -Galactosidaseaktivitätsmessung

Zur Bestimmung der Transkriptionsrate von *sipA* wurde ein *Salmonella* Typhimurium Stamm mit chromosomaler *sipA-lacZ*-Transkriptionsfusion verwendet (Konstruktion dieses Stammes und verwendetes Suizidplasmid sind unter 4.4 beschrieben). Die Aktivität der in Abhängigkeit von der *sipA*-Transkription produzierten  $\beta$ -Galactosidase wurde über eine Farbreaktion bestimmt: Das Enzym katalysiert die Umsetzung des farblosen o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid zu  $\beta$ -D-Galactose und dem bei 550nm stark absorbierenden o-Nitrophenol.

Zur Aktivitätsbestimmung wurde 0.1ml der zu analysierenden Kultur in 0.9ml Z-Puffer mit 10 $\mu$ l 0.1%SDS und 20 $\mu$ l Chloroform lysiert, 10s heftig geschüttelt und bei 37°C equilibriert. Ausserdem wurde die OD<sub>600</sub> der Kultur bestimmt.

Mit der Zugabe von 0.2ml 4mg/ml ONPG (o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid, Fluka) in A-Medium wurde die Reaktion gestartet. Es wurde die Zeit *t* in Minuten bis zur Gelbfärbung der Reaktionsmischung gemessen und die Reaktion sofort durch Zugabe von 0.5ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gestoppt. Von der resultierenden Mischung wurde die Absorption bei 420nm und bei 550nm bestimmt. Die *lacZ*-Aktivität wurde nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{Aktivität} / \text{min}^{-1} = 1000 \cdot \frac{A_{420} - (1.75 \cdot A_{550})}{t \cdot 0.1 \cdot OD_{600}}$$

### 4.3.5 $\beta$ -Galactosidaseaktivitätsmessung in Zellkulturinfektionsexperimenten

COS7-Zellen wurden für 2 Tage in 35mm Zellkulturschalen kultiviert, zweimal mit HBSS gewaschen, mit 2ml DME-Medium (ohne FCS) 10min im Brutschrank inkubiert und mit 50 $\mu$ l einer SPI-1-induzierten Kultur von M1309 infiziert. Parallel dazu wurden 35mm

Zellkulturschalen, welche zuvor 1h in Zellkulturmedium ohne Zellen im Brutschrank inkubiert und dann gleich wie die COS7-Zellen gewaschen worden waren, auf dieselbe Weise „infiziert“.

Nach einer Stunde wurde den Zellkulturschalen 1ml 0.3% Natriumdesoxycholat (Fluka) in DME-Medium zu einer Endkonzentration von 0.1% zugegeben und die Suspension aus Bakterien und lysierten Zellen in den Schalen nach mehrmaligem auf- und abpipettieren in Zentrifugenröhrchen überführt.

Die Suspension wurde für 5min bei 5000\*g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 1ml HBSS resuspendiert, erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert und in 150µl HBSS resuspendiert. 50µl dieser Suspension wurden  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  verdünnt und auf LB-Agar mit Tetracyclin und Streptomycin ausplattiert. Die restlichen 100µl wurden für die  $\beta$ -Galactosidaseaktivitätsmessung, wie unter 4.3.4 beschrieben, eingesetzt. In diesem Falle wurde die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität mit Hilfe des cfu-Werts (colony forming units, entspricht der Anzahl lebensfähiger Bakterien) normiert. Die cfu-Zahl wurde durch Ausplattieren bestimmt. Die relativen Werte der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität bezüglich der cfu in der eingesetzten Suspension berechneten sich nach der folgenden Formel:

$$\text{Aktivität} = \frac{2}{3} \cdot \frac{A_{420} - (1.75 \cdot A_{550})}{t \cdot \text{cfu}}$$

Der Vorfaktor 2/3 kommt zustande, da für die Messung nur 2/3 (=100µl) der Suspension eingesetzt wurden. Dies ist aber nur von formaler Bedeutung, da es sich bei der Berechnung um relative Werte handelt.

## 4.4 Konstruktion von Stämmen und Plasmiden

Die Stämme M1300-1303 (chromosomale M45-Markierung von SipA) bzw. M1309-1312 (transkriptionelle *lacZ*-Fusion mit *sipA*, chromosomal) wurden aus den Stämmen SB300, SB161, M556 und M557 mittels Konjugation des Suizidplasmids pM1300 bzw. pM1303 konstruiert.

Die Expression von SipA<sub>M45</sub> in den Stämmen M1300-M1304 wurde mittels Western Blot Analyse überprüft. Bei den Stämmen M1309-1312 wurde die Transkription von *sipA-lacZ* unter SPI-1 induzierenden Bedingungen durch  $\beta$ -Galactosidaseaktivitätsmessung bestimmt.

Der Stamm M1304 (chromosomale M45-Markierung von SipA) wurde durch Phagentransduktion von M712 mit einem P22-Lysat von M1300 konstruiert. Mit Hilfe derselben Methode wurde der

Stamm M1306 durch P22-Transduktion des *ssrB::mTn5*-Allels aus P8G12 in den Wildtypstamm SB300 konstruiert.

Zur Konstruktion von pM1300 wurde pSB377 mit *Sma*I und *Xba*I verdaut und das resultierende 2695bp-Fragment dephosphoryliert. Als Insert diente das 969bp-Fragment aus dem Verdau von pM578 mit *Mun*I und *Xba*I, bei dem nach Verdau mit *Mun*I der 5'-Überhang mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt worden war. Als Rückgrat für pM1303 diente ebenfalls pSB377, welches mit *Xba*I linearisiert und danach dephosphoryliert worden war. Es wurde das 3,5kb-Fragment des Verdaus von pM185 mit *Xba*I in den linearisierten Vektor pSB377 kloniert.

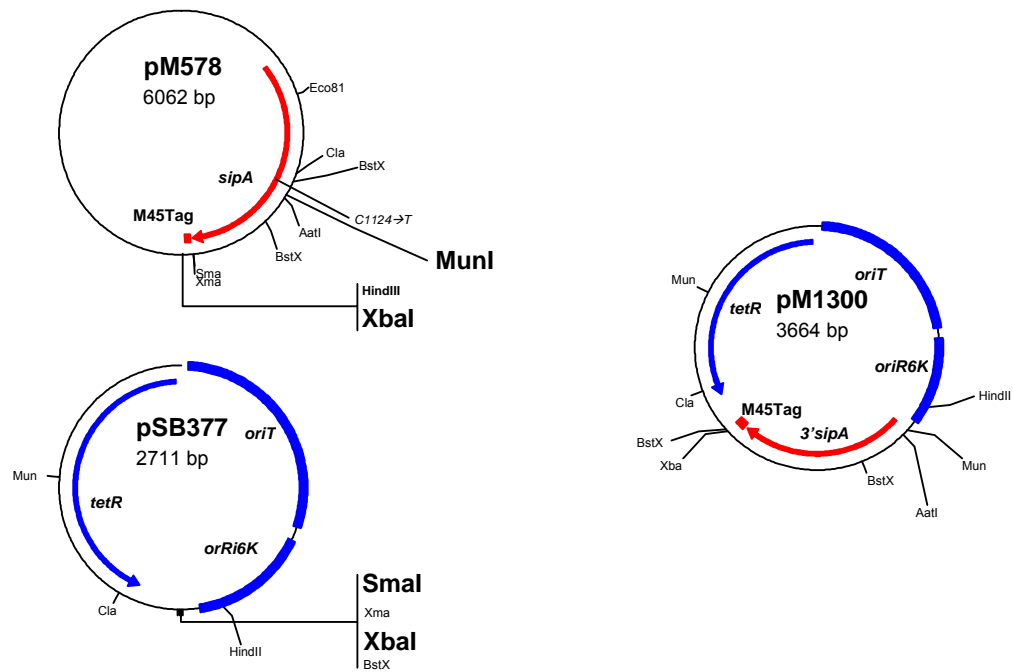
Die Sequenzierung von pM578 zeigte eine Punktmutation in *sipA*, welche zu einem Aminosäureaustausch führte (Thr<sup>375</sup>→Met). Obwohl diese Mutation ausserhalb des für pM1300 verwendeten Bereichs lag, wurde pM578 für weiteren Gebrauch kuriert. Hierzu wurde das 380bp-Fragment aus dem Verdau von pM712 mit *Bst*XI in das dephosphorylierte 5.7kb-Fragment aus dem Verdau von pM578 mit *Bst*XI kloniert; dies ergab das Plasmid pM1301.

Die erhaltenen Plasmide wurden mittels Restriktionsverdau auf Vorhandensein und richtige Orientierung des Inserts geprüft. Bei pM1301 wurde zusätzlich *sipA* sequenziert. Die Klonierungen sind in Abb. 4 zusammengefasst.

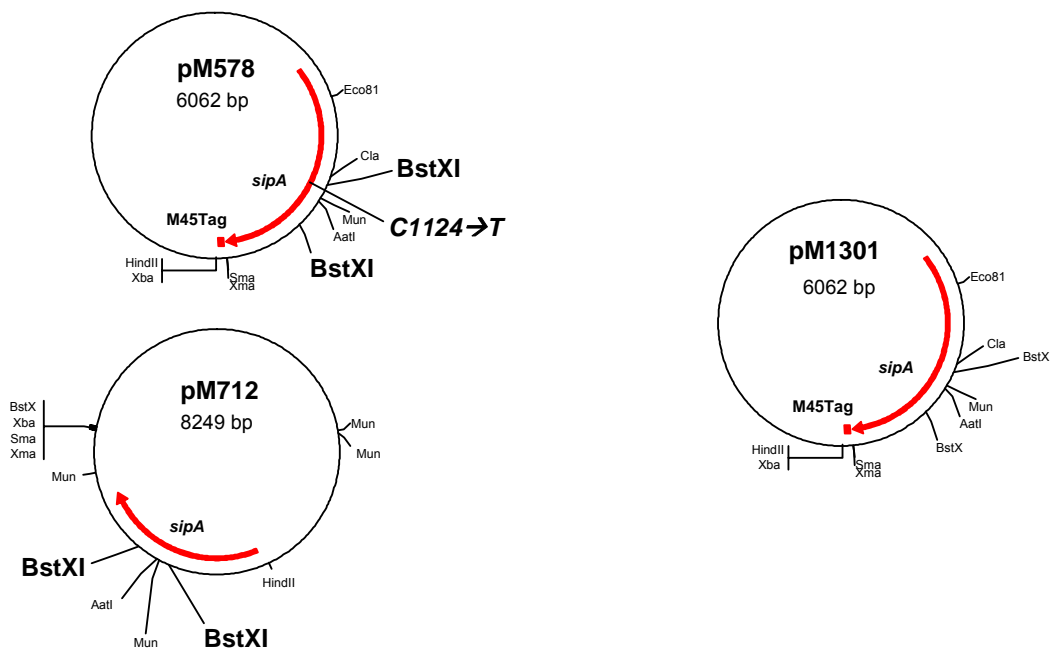
*E. coli*  $\chi$ 6060 wurde zur Präparation der Ausgangsplasmide pM185, pM578 und pM712 und während der Konstruktion von pM1301 verwendet, der *E. coli*-Stamm CC118 $\lambda$ pir zur Präparation von pSB377 sowie zur Konstruktion und Präparation der Suizidvektoren pM1300 und pM1303. *E. coli* SM10 $\lambda$ pir diente zur Konjugation von pM1300 und pM1303 in die entsprechenden Stämme von *Salmonella* Typhimurium.

Alle erhaltenen und konstruierten Stämme und Plasmide sind in Tab. 2 zusammengefasst.

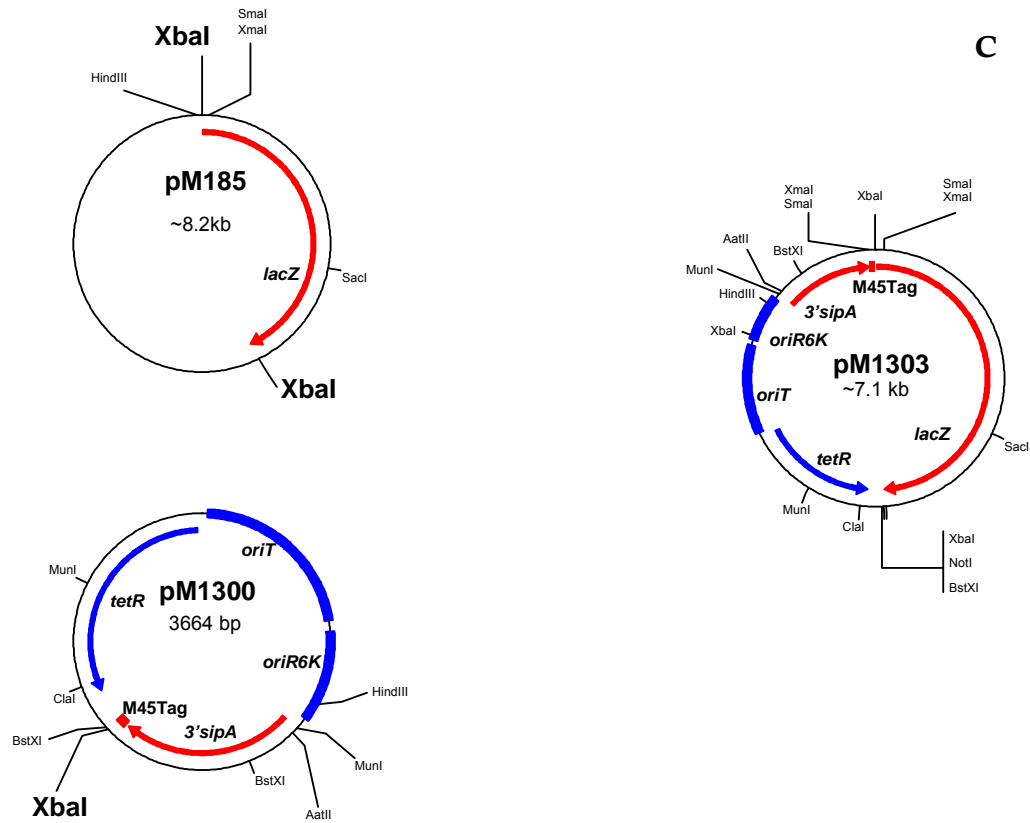
A



B







**Abb. 4** Zusammenfassung der Plasmide, die in der vorliegenden Arbeit konstruiert wurden. **A\*** (vorhergehende Seite): Konstruktion des Suizidplasmids pM1300 aus pM578 und pSB377. pM578 wurde dabei zuerst mit *MunI* verdaut und der entstehende 5'-Überhang mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt. Danach erst wurde das linearisierte Plasmid mit *XbaI* verdaut. **B** (vorhergehende Seite): Kurieren der Punktmutation in pM578 durch Ersetzen des *BstXI*-Fragments durch das entsprechende *BstXI*-Fragment aus pM712 ohne Punktmutation. **C**: Konstruktion des Suizidplasmids pM1303 aus pM1300 und pM185. Durch Restriktionsanalyse mit *SacI* und *HindIII* wurde die richtige Orientierung des Inserts überprüft.

**Tab. 2** In der vorliegenden Arbeit verwendete Stämme von *Salmonella enterica* serovar Typhimurium und *Escherichia coli* sowie die verwendeten Plasmide (folgende Seite).

<i>S. Typhimurium</i> Stamm	Genotyp	Hintergrund	Referenz
SB300	Wildtyp, durch Maus passagiert	SL1344	(Hoiseth and Stocker 1981)
SB161	$\Delta invG$	SL1344	(Kaniga, Bossio et al. 1994)
M556	<i>sseD::aphT</i>	SL1344	(Hapfelmeier, Ehrbar et al. 2004)
M557	$\Delta invG$ , <i>sseD::aphT</i>	SL1344	(Hapfelmeier, Ehrbar et al. 2004)
M712	$\Delta sopABEE2$ , $\Delta sipA$	SL1344	(Ehrbar, Friebe et al. 2003)
M1300	<i>sipA::pM1300</i>	SL1344	vorliegende Arbeit
M1301	$\Delta invG$ , <i>sipA::pM1300</i>	SL1344	vorliegende Arbeit
M1302	<i>sseD::aphT</i> , <i>sipA::pM1300</i>	SL1344	vorliegende Arbeit
M1303	$\Delta invG$ , <i>sseD::aphT</i> , <i>sipA::pM1300</i>	SL1344	vorliegende Arbeit
M1304	$\Delta sopABEE2$ , <i>sipA::pM1300</i>	SL1344	vorliegende Arbeit
M1306	<i>ssrB::mTn5</i>	SL1344	vorliegende Arbeit
M1309	<i>sipA::pM1303</i>	SL1344	vorliegende Arbeit
M1310	$\Delta invG$ , <i>sipA::pM1303</i>	SL1344	vorliegende Arbeit
M1311	<i>sseD::aphT</i> , <i>sipA::pM1303</i>	SL1344	vorliegende Arbeit
M1312	$\Delta invG$ , <i>sseD::aphT</i> , <i>sipA::pM1303</i>	SL1344	vorliegende Arbeit
P8G12	<i>ssrB::mTn5</i>	NCTC12023	(Jantsch, Cheminay et al. 2003)
<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Referenz	
$\chi 6060$	<i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697$ , $\Delta lacX74$ , <i>galK</i> , $\Delta phoA20$ , <i>recA1</i> , <i>rpsE</i> , <i>argE(Am)</i> , <i>rpoB</i> , <i>thi</i> , [F' ( <i>traD36 proA</i> <sup>+</sup> <i>proB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>f</sup> <i>lacZ</i> $\Delta$ M15)::Tn5]	(Goldschmidt, Thoren-Gordon et al. 1990)	
CC118 $\lambda$ pir	<i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697$ , $\Delta lacX74$ , <i>galK</i> , $\Delta phoA20$ , <i>galE</i> , <i>recA1</i> , <i>rpsE</i> , <i>argE(Am)</i> , <i>rpoB</i> , <i>thi</i> , $\lambda$ pir	(Herrero, de Lorenzo et al. 1990)	
SM10 $\lambda$ pir	<i>thi-1</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>tonA</i> , <i>lacY</i> , <i>supE</i> , <i>recA::RP4-2-Tc::Mu</i> , <i>Km</i> <sup>r</sup> , $\lambda$ pir	(Miller and Mekalanos 1988)	

Tab. 2 (fortgesetzt)

Plasmid	Insert/Beschreibung	Referenz
p2129	<i>sseJ<sub>M45</sub></i> , niedrige Kopienzahl	(Hansen-Wester, Stecher et al. 2002)
pCJLA-RFPexp	RFP unter <i>lac</i> -Promotor, niedrige Kopienzahl	Jacobi, C., nicht publiziert
pM185	<i>sopE-lacZ</i> Reporterplasmid, niedrige Kopienzahl	Hardt, WD., nicht publiziert
pM578	<i>sipA<sub>M45</sub></i> , hohe Kopienzahl	Ehrbar, K., nicht publiziert
pM712	<i>sipA</i> Komplementationsplasmid, niedrige Kopienzahl	(Hapfelmeier, Ehrbar et al. 2004)
pM965	<i>p<sub>tpsM</sub></i> -GFP (konstitutiv), niedrige Kopienzahl	Stecher, B. 2004, im Druck
pM972	<i>p<sub>sicA</sub></i> -GFP Reporterplasmid, niedrige Kopienzahl	Stecher, B., nicht publiziert
pM973	<i>p<sub>ssaG</sub></i> -GFP Reporterplasmid, niedrige Kopienzahl	Stecher, B., nicht publiziert
pM979	<i>p<sub>tpsM</sub></i> -GFP (konstitutiv), hohe Kopienzahl	Stecher, B. 2004, im Druck
pM1300	3' <i>sipA<sub>M45</sub></i> Suizidvektor, pSB377-Hintergrund	vorliegende Arbeit
pM1301	<i>sipA<sub>M45</sub></i> , identisch mit pM578, ohne Punktmutation in <i>sipA</i>	vorliegende Arbeit
pM1303	3' <i>sipA-lacZ</i> Suizidvektor, pSB377-Hintergrund	vorliegende Arbeit
pSB377	Suizidvektor, enthält <i>oriR6K</i>	Kaniga, K., nicht publiziert

## 4.5 Anzuchtbedingungen für Bakterien

Bakterien wurden in LB-Medium beziehungsweise auf LB-Agar bei 37°C während 12-18 Stunden kultiviert. Flüssigkulturen wurden innerhalb eines Tages ihrer Verwendung zugeführt. Kolonien auf LB-Agar wurden bei Lagerung bei 4°C bis zu einer Woche verwendet. Die verwendeten Antibiotika und deren Konzentration sind Tab. 3 zu entnehmen.

Zur Induktion von SPI-1 wurden *Salmonella*-Kulturen in 3ml 0.3M NaCl LB-Medium während 12 Stunden unter schwacher Belüftung mit der Hälfte der gewöhnlichen Antibiotikakonzentration (Tab. 3) bei 37°C inkubiert. Mit 100µl dieser Kulturen wurden jeweils 2ml 0.3M NaCl LB-Medium ohne Antibiotika beimpft und während vier Stunden unter schwacher Belüftung bei 37°C subkultiviert.

Zur Induktion von SPI-2 wurden die Bakterien während 16-18h in F-Medium unter Schütteln bei 37°C kultiviert.

**Tab. 3** In der vorliegenden Arbeit verwendete Antibiotika. Die Antibiotika wurden als 1000x Stammlösung (bzw. 4000x für Gentamicin und 300x für Chloramphenicol) ins entsprechende Medium gegeben.

Antibiotikum/Lösungsmittel	Endkonzentration	Stämme/Plasmide mit Resistenz
Ampicillin/H <sub>2</sub> O	100µg/ml	p2129, pM185, pM578, pM580, pM712, pM965, pM972, pM973, pM979, pM1301
Chloramphenicol/MeOH	100µg/ml	Verwendet für Infektionsexperimente, pCJLA-RFPexp
Gentamicin/H <sub>2</sub> O	100µg/ml	Verwendet für Infektionsexperimente
Kanamycin/H <sub>2</sub> O	50µg/ml	M1306, P8G12, pCJLA-RFPexp
Streptomycin/H <sub>2</sub> O	50µg/ml	Alle verwendeten <i>S. Typhimurium</i>
Tetracyclin/EtOH(70%)	12.5µg/ml	M1300-M1304, M1309-M1312, pM1300, pM1303, pSB377

## 4.6 Anzuchtbedingungen für COS7-Zellen

Für alle Infektionsexperimente wurden COS7-Zellen (Gluzman 1981) verwendet. Die Zellen wurden in 5ml DME-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose, Omnilab) mit 5% fötalem Kälberserum (FCS, Invitrogen) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in 25cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen kultiviert. Alle zwei bis vier Tage (bei 90-100% Konfluenz) wurden die Kulturen nach folgendem Protokoll in neues Medium überführt: Das alte Medium wurde vorsichtig abgezogen und der Zellrasen mit 5ml PBS (Omnilab) gewaschen. Es wurden 1.5ml 1/1 mit PBS verdünntes Trypsin/EDTA (Omnilab) zugegeben und die Zellen für 5min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden danach mit 5ml DME-Medium aus den Zellkulturflaschen gewaschen und in ein 14ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 5min Zentrifugation bei Raumtemperatur und 300-700\*g wurde der Überstand entfernt und die sedimentierten Zellen in 4ml DME-Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde zur Weiterführung der Zellkultur in neuen Zellkulturflaschen mit DME-Medium auf das 5-10fache verdünnt und weiterkultiviert.

Für Zellkulturinfektionsexperimente für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden zwei Tage vor der Infektion 12mm-Mikroskopierdeckgläser (Dicke: 0.17mm) mit jeweils 0.5ml 1/10 in DME-Medium verdünnter Zellsuspension besät und bis zu einer Konfluenz von 60-80% kultiviert. Für Experimente mit nachfolgender Lyse und β-Galactosidaseaktivitätsbestimmung wurden 35-mm Zellkulturschalen mit jeweils 3ml 1/10 verdünnter Zellsuspension besät und für 2 Tage weiterkultiviert.

Sämtliche Waschschrte sowie die Kultivierung der Zellen auf Mikroskopierdeckgläsern/Zellkulturschalen wurden, soweit nicht anders erwähnt, mit DME-Medium (mit 5% fötalem Kälberserum (FCS)) ohne Antibiotika durchgeführt, für die Weiterführung der Zellkultur wurde dasselbe Medium mit 100µg/ml Penicillin/Streptomycin (Omnilab) verwendet.

## 4.7 Immobilisierung von Bakterien auf Glasoberflächen

*Salmonella* Typhimurium haftet sehr schlecht auf Glasoberflächen. Aus diesem Grund wurden für Immunfluoreszenzexperimente an Bakterien in Abwesenheit von Wirtszellen die verwendeten Mikroskopierdeckgläser mit Gelatine beschichtet. Hierzu wurden 12mm-Mikroskopierdeckgläser für 1h bei Raumtemperatur in 80% Ethanol mit 10% KOH inkubiert, zweimal gründlich mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und über Nacht bei 4°C in einer Lösung von 0.1% Gelatine (Bacteriological Grade, Oxoid) in ddH<sub>2</sub>O inkubiert. Die Deckgläser wurden danach für 1h in Zellkulturmedium (DMEM mit 5%FCS) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Zellkulturbrutschrank inkubiert, 10min vor Zugabe der Bakterien dreimal mit HBSS gewaschen und bis zum Beginn des Versuchs weiterhin im Zellkulturbrutschrank inkubiert.

## 4.8 Optimierung der Permeabilisierungsbedingungen für extrazelluläre Bakterien

Zur Permeabilisierung der Bakterienzellwand wurde Lysozym (aus Hühnereiweiss, Fluka) verwendet. Anhand einer Immunfluoreszenzfärbung gegen GFP in einem konstitutiv GFP exprimierenden *Salmonella* Stamm (M1300 pM979) wurde die Effizienz der Permeabilisation optimiert. 8µl einer SPI-1-induzierten Bakterienkultur wurden hierfür auf gelatinebedeckte Deckgläser (siehe 4.7) gegeben und nach 15min fixiert. Es wurden verschiedene Bedingungen für die Membranpermeabilisierung mit TritonX 100 sowie einen nachfolgenden Verdau mit Lysozym getestet (Abb. 12). Die prozentuale Effizienz der Permeabilisierung wurde mit Hilfe eines α-GFP-Antikörpers und der Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt. Sie ergab sich aus dem Verhältnis von Bakterien, bei welchen die α-GFP Färbung (mit einem sekundären AMCA-Konjugat nachgewiesen) mit GFP kolokalisiert war, zur Gesamtzahl der GFP exprimierenden Bakterien (Abb. 12). Letztere war aufgrund der inhärenten Fluoreszenz des GFP nachweisbar.

## 4.9 Zellkulturinfektionsexperimente

### 4.9.1 Einfache Infektionsexperimente

Für die Infektionsexperimente wurden COS7-Zellen wie unter 4.6 beschrieben ausgesät. 10min vor Infektion wurden die Zellen dreimal mit HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Invitrogen) gewaschen und bis zur Infektion bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Infektion erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, unter folgenden Bedingungen: Zu den Zellen wurden 3µl SPI-1-induzierte Bakterien gegeben und bis zum Ablauf der festgesetzten Infektionsdauer im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Für Infektionszeiten von über einer Stunde wurden die Zellen 60min nach Infektion dreimal mit HBSS gewaschen und für die restliche Infektionszeit in DMEM mit 5% FCS und 100µg/ml Gentamicin inkubiert, um extrazelluläre Bakterien zu eliminieren.

### 4.9.2 Infektionsexperimente zur Untersuchung der zellkontaktabhängigen SipA-Sekretion

Die SPI-1-induzierte Bakterienkultur wurde für unterschiedliche Zeiträume in HBSS mit Chloramphenicol vorinkubiert. Hierzu wurden 16µl SPI-1-induzierte Bakterienkultur in 1ml HBSS mit 100µg/ml Chloramphenicol gegeben und bei 37°C im Zellkulturbrutschrank inkubiert. COS7-Zellen und gelatinevorbehandelte Mikroskopierdeckgläser wurden wie unter 4.6 und 4.7 beschrieben vorbereitet. Nach Ablauf der Inkubationszeit der Bakterien (zwischen 0 und 60min) wurde bei COS7-Zellen und gelatinevorbehandelten Mikroskopierdeckgläsern das HBSS abgezogen und durch jeweils 0.5ml der vorinkubierten Bakteriensuspension ersetzt. Die Proben wurden danach für weitere 20min im Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und, sofern nicht anderweitig erwähnt, gemäss 4.9.4 fixiert und gefärbt.

### 4.9.3 Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung ohne Lysozymverdau

Nach Ablauf der Infektionszeit wurden die Präparate in 4% Paraformaldehyd (in PBS) gegeben und für 1h bei 4°C inkubiert. Zur besseren Konservierung von GFP wurden die Präparate danach bis zur weiteren Verwendung bei 4°C in 20% Saccharose in PBS aufbewahrt (maximal 1 Tag).

Die Zellen wurden mit 0.1% TritonX 100 in PBS während 5min permeabilisiert und mit 5% Rinderserumalbumin (Albumin Fraction V, AppliChem) in PBS während 1h bei Raumtemperatur

oder über Nacht bei 4°C blockiert. Primäre und sekundäre Antikörper wurden in den in Tab. 4 angegebenen Verdünnungen während 1h bei Raumtemperatur appliziert. Falls 4',6'-Diamidino-2-phenylindol-(HCl)<sub>2</sub> (DAPI) zur Färbung der DNA verwendet wurde, wurde es nach Anwendung des sekundären Antikörpers mit einer Konzentration von 0.5-1µg/ml in PBS für 5-10min zugegeben. Die Präparate wurden mit Vectashield® (Vector Laboratories) eingedeckelt.

#### **4.9.4 Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung mit Lysozymverdau**

Nach Ablauf der Infektionszeit wurden die Präparate in 4% Paraformaldehyd (in PBS) gegeben und für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Permeabilisierung der Zell- und Bakterienmembranen erfolgte im dafür optimierten Puffer (LPS-Permeabilisierungspuffer, siehe 4.1) bei Raumtemperatur während 5min. Danach wurden die Präparate dreimal mit Lysozympuffer gewaschen und während 1h bei 4°C mit 5g Lysozym (aus Hühnereiweiss, Fluka) in Lysozympuffer inkubiert. Die Präparate wurden danach blockiert und wie unter 4.9.3 beschrieben gefärbt.

#### **4.9.5 Immunfluoreszenzmikroskopie**

Alle gezeigten Bilder wurden mit einem 100x Ölobjectiv (Zeiss) aufgenommen. Es wurden ein konfokales Perkin Elmer Ultraview System und ein Zeiss Axiovert 200M Mikroskop verwendet. Rote (Cy3, Rhodamin) und grüne (GFP, FITC) Fluoreszenz wurden je nach Experiment konfokal (alle Abbildungen ausser Abb. 11 und Abb. 12) oder mittels Epifluoreszenzmikroskopie (Abb. 11 und Abb. 12) aufgenommen, blaue (DAPI, AMCA) Fluoreszenz ausschliesslich mittels Epifluoreszenzmikroskopie. Alle semiquantitativen Auswertungen wurden mit Epifluoreszenzmikroskopie vorgenommen.

Die Bilder wurden mit der UltraView Imaging Suite (Version 5.2, Perkin Elmer) elektronisch bearbeitet. Für die Bearbeitung konfokaler Stapel wurde Volocity™ (Version 6.2.1, Improvision) verwendet.

**Tab. 4** Bei Western Blot- und Immunfluoreszenzexperimenten verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen im entsprechenden Blockierungspuffer.

Antikörper/Serum	Herkunft (Referenz)	Verdünnung im Blockierungspuffer	Blockierungspuffer
$\alpha$ -GFP	Kaninchen (R. Glockshuber) (Philipps, Hennecke et al. 2003)	1:200	5% BSA in PBS
$\alpha$ -M45 (Hybridomüberstand)	Maus (Obert, O'Connor et al. 1994)	Immunfluoreszenz: 1:4	5% BSA in PBS
$\alpha$ -M45 (Hybridomüberstand)	Maus (Obert, O'Connor et al. 1994)	Western Blot Analyse: 1:30	5% Milchpulver in PBS 0.1% Tween 20
$\alpha$ -Maus Cy3 (Cy3-conjugated AffiniPure Fab fragment goat anti- mouse)	Ziege (Jackson Immuno Research)	1:200	5% BSA in PBS
$\alpha$ -Maus HRP (Anti-mouse IgG peroxidase coniugate)	Ziege (Sigma-Aldrich)	1:5000	5% Milchpulver in PBS 0.1% Tween 20
$\alpha$ - <i>Salmonella</i> (polyclonal rabbit anti <i>Salmonella</i> O antigen group B (factors 1, 4, 5, 12) serum)	Kaninchen (Difco)	Extrazellulärfärbung: 1:500 Allgemeine Färbung: 1:250	5% BSA in PBS
$\alpha$ -Kaninchen AMCA (AMCA-conjugated AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> fragment Goat anti-rabbit IgG)	Ziege (Jackson Immuno Research)	1:200	5% BSA in PBS
$\alpha$ -Kaninchen FITC (Anti-Rabbit IgG FITC conjugate)	Ziege (Sigma-Aldrich)	1:400	5% BSA in PBS
$\alpha$ -Kaninchen Rhodamin (Rhodamine (TRITC)- conjugated AffiniPure Goat anti-rabbit IgG)	Ziege (Jackson Immuno Research)	1:500	5% BSA in PBS



## 5 Resultate

### 5.1 Aktivitäten von SPI-1 und SPI-2

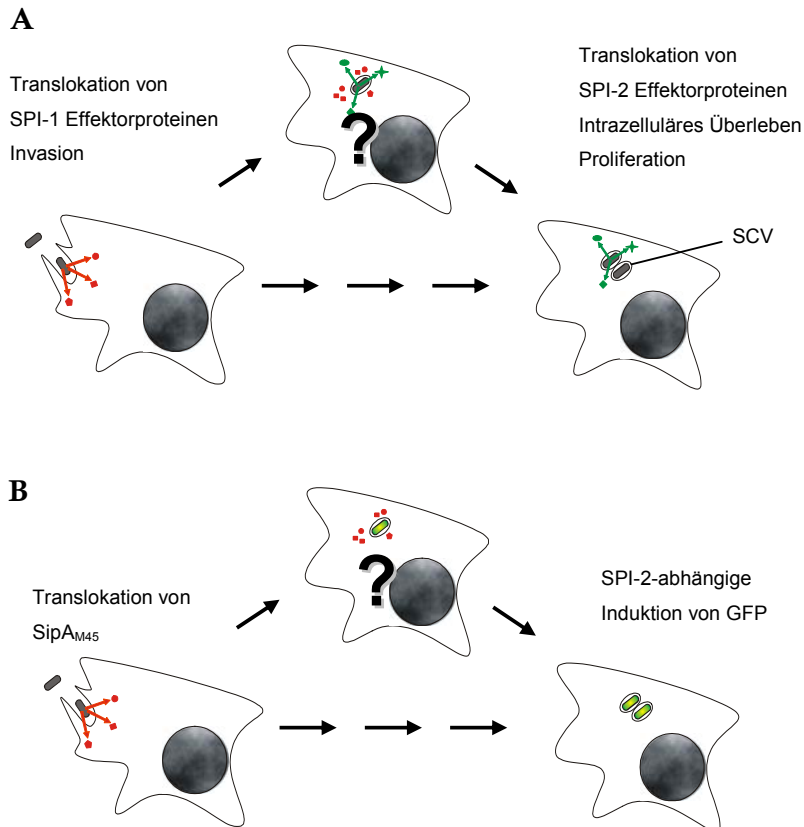
#### 5.1.1 \* Zeitlicher Verlauf von SipA-Sekretion und SPI-2-Induktion

Die von SPI-1 und SPI-2 abhängige Virulenz wurde bislang eher funktionell getrennt betrachtet (Hansen-Wester and Hensel 2001). Die Hypothese von zwei zeitlich getrennt wirkenden TTSS sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, wobei die Möglichkeit eines gleichzeitigen Wirkens von SPI-1 und SPI-2 in Betracht gezogen wurde (Abb. 5). Falls Effektoren von SPI-1 und SPI-2 gleichzeitig in einer Wirtszelle ihre Wirkung entfalteten, mussten sie auch gleichzeitig innerhalb dieser Zelle mit Fluoreszenzmikroskopie nachweisbar sein.

Ziel dieses Teilprojekts war es, die Translokation von SipA mit dem Zeitlichen Verlauf der Induktion des SPI-2 TTSS zu vergleichen. Hierfür sollten mit Fluoreszenzmikroskopie einzelne Zellen untersucht werden. Es wurden COS7-Zellen mit *Salmonella* Typhimurium Stamm M1300 pM973 über unterschiedliche Zeiträume infiziert. SipA ist in M1300 chromosomal M45-markiert. Für den Nachweis von SipA<sub>M45</sub> in der Wirtszelle konnte somit der gut charakterisierte  $\alpha$ -M45 Antikörper eingesetzt werden. Die Bakterien trugen ausserdem das Plasmid pM973, welches für GFP unter dem *ssaG*-Promotor codiert. SsaG ist ein Apparatprotein des auf SPI-2 codierten TTSS (Cirillo, Valdivia et al. 1998; Hensel, Shea et al. 1998), dessen Promotor durch differentielle Fluoreszenzinduktion mit *Salmonella* Typhimurium in Makrophagen entdeckt wurde (Valdivia and Falkow 1997). Die inhärente Fluoreszenz von GFP konnte somit für den Nachweis der Expression von SPI-2 Genen verwendet werden.

Bei jedem Versuch wurden für jeden einzelnen Zeitpunkt 20-30 infizierte Zellen analysiert, wobei eine Zelle, die mit mehr als drei Bakterien (DAPI) im Bereich ihres Zellkörpers (Phasenkontrast) assoziiert war, als infiziert betrachtet wurde. Das von M1300 sekretierte SipA<sub>M45</sub> bildete ein wolkenförmiges Halo in unmittelbarer Nähe zu den Bakterien (siehe Überlagerung von GFP(Bakterien)- und Cy3(SipA)-Kanal in Abb. 6, insbesondere Detailansicht). Das Plasmid

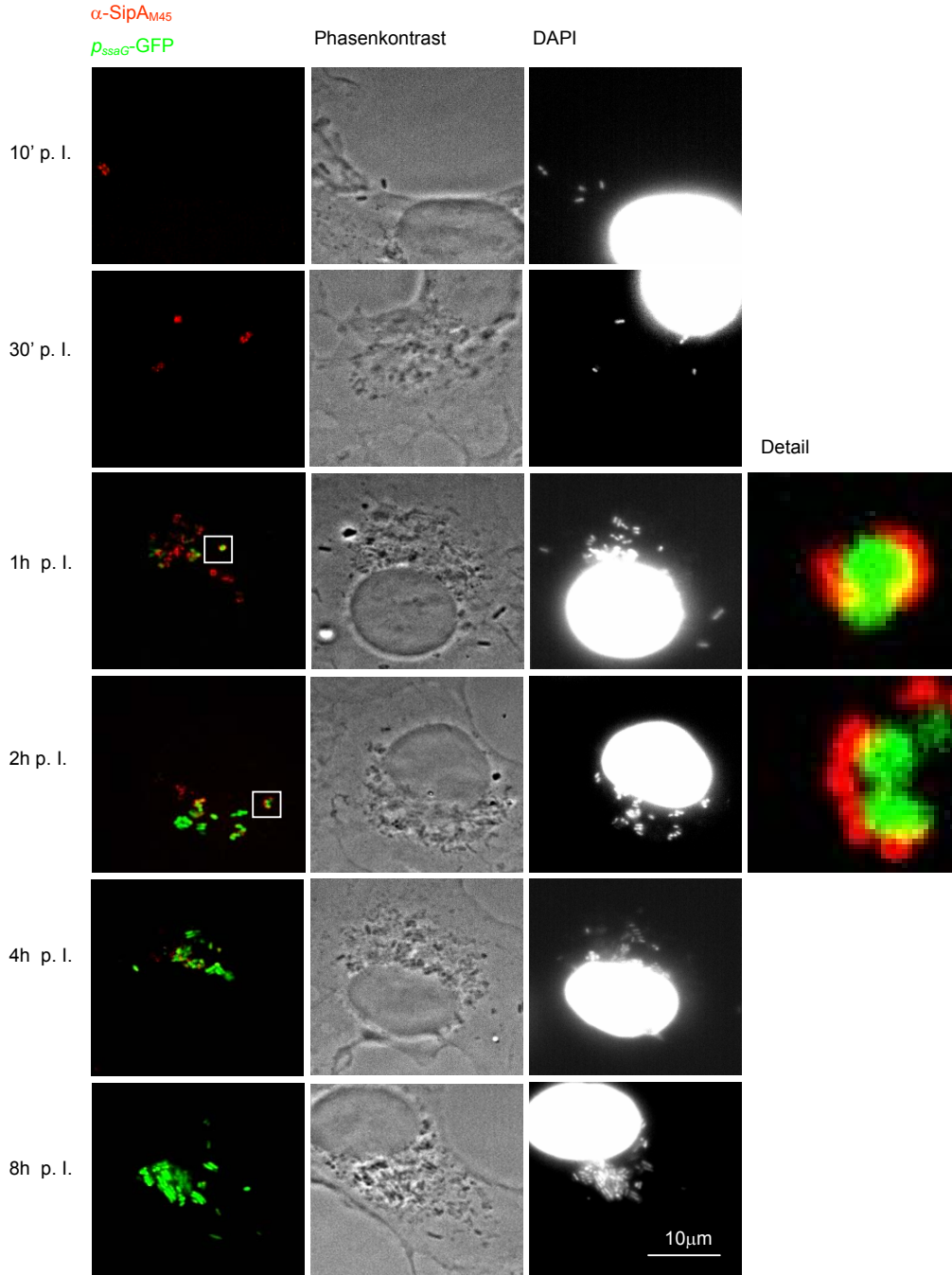
pM973 codiert GFP unter der Kontrolle des *ssaG*-Promotors und diente als Reporterkonstrukt für die Induktion von Genen des SPI-2-codierten TTSS. So wurde die Fluoreszenz von SPI-2-abhängig exprimiertem GFP und die Anwesenheit von  $\alpha$ -M45 gefärbtem SipA<sub>M45</sub> für jedes Bakterium einer betrachteten infizierten Zelle bewertet (Abb. 5).



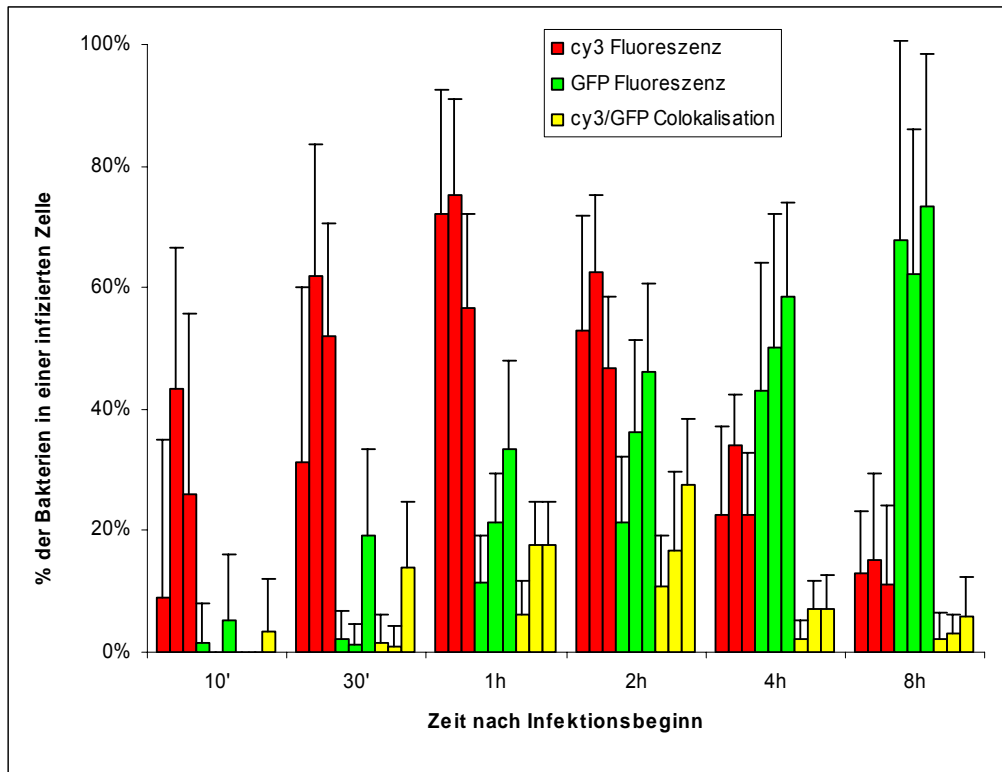
**Abb. 5** Postulierte Wirkungsweise von SPI-1 und SPI-2 bei der Infektion von Epithelzellen durch *Salmonella Typhimurium* und ihre Untersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie. **A:** Schematischer Infektionsverlauf. Das Bakterium bewirkt durch Translokation von Effektorproteinen über das SPI-1 TTSS seine Internalisierung durch die Wirtszelle. Nach der Internalisierung verhindert *Salmonella Typhimurium* durch Translokation von Effektorproteinen über das SPI-2 TTSS seine Degradation und induziert die Bildung einer „*Salmonella*-containing Vacuole“ (SCV), in welcher das Bakterium proliferiert. Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war es, eine mögliche Überlappung von SPI-1- und SPI-2-Aktivität zu untersuchen (mit einem Fragezeichen gekennzeichnet). **B:** Untersuchung der Abläufe während der Zellkulturinfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie: Zur Untersuchung der SPI-1-Aktivität wurde transloziertes SipA<sub>M45</sub> immungefärbt. Zum Nachweis der SPI-2-Aktivität wurde die GFP-Expression eines SPI-2-abhängigen Reporterkonstrukts untersucht.

Es stellte sich heraus, dass schon ein bis zwei Stunden nach Infektion in vielen Bakterien eine deutliche GFP-Fluoreszenz detektierbar war. Die nachweisbare Menge des M45-markierten SipA war 1h nach Infektionsbeginn am grössten und nahm nach 4h stark ab. Bis 4h nach Infektion war SipA<sub>M45</sub> aber bei vielen Bakterien noch gut erkennbar. Ein und zwei Stunden nach Infektion liess sich ausserdem bei einer beträchtlichen Anzahl von Bakterien die Kolokalisation von GFP-Fluoreszenz und SipA<sub>M45</sub> bei ein und demselben Bakterium zeigen (Abb. 6, Detail). Die Induktion von auf SPI-2 codierten Genen wird als eindeutiges Merkmal der intrazellulären Phase des Lebenszyklus von *Salmonella* Typhimurium betrachtet (Hensel 2000). Der Beginn dieser Phase kann bei den vorliegenden Infektionsexperimenten mit COS7-Zellen auf ein bis zwei Stunden nach Infektion geschätzt werden, da bei einer grossen Zahl von Bakterien schon die Induktion von *ssaG* über das *p<sub>ssaG</sub>*-GFP Reporterkonstrukt nachgewiesen werden konnte. Zu denselben Zeitpunkten liess sich bei der Mehrzahl der mit Zellen assoziierten Bakterien SipA<sub>M45</sub> nachweisen. Diese Beobachtungen legen nahe, dass SipA auch nach der Invasion noch längere Zeit um die Bakterien lokalisiert bleibt und funktionell ist.

Die frühe Induktion von SPI-2 codierten Genen gaben Anlass zum Versuch, mittels Immunfluoreszenzfärbungen SPI-2 Effektoren und SipA in denselben Zellen nachzuweisen. Dies scheiterte jedoch bei allen untersuchten Proteinen (SspH2<sub>M45</sub>, SifA<sub>M45</sub> und SseJ<sub>M45</sub>); frühestens nach acht Stunden waren die M45-markierten Proteine deutlich nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Zu diesem Zeitpunkt waren aber keine signifikanten Mengen an SipA<sub>M45</sub> mehr in den infizierten Zellen nachzuweisen (Abb. 6, Abb. 7). Die offensichtliche Diskrepanz zwischen dem frühen Nachweis der SPI-2 Geninduktion und der bis zu vier Stunden verzögerten SPI-2 Effektorproteinsekretion liess sich im Verlauf dieser Arbeit nicht erklären.



**Abb. 6** Immunfluoreszenzaufnahmen von COS7-Zellen, welche mit M1300 (*sipA*::pM1300) pM973 (*p<sub>ssaG</sub>*-GFP) infiziert wurden, zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion. Erste Bildspalte: Überlagerung der Cy3- (rot) und der GFP-Fluoreszenz (grün) Beim 1h- und 2h- Zeitpunkt ist der markierte Bildausschnitt vergrößert in der vierten Bildspalte dargestellt, wo die wolkenförmige Anordnung von SipA um eindeutig GFP exprimierende Bakterien besonders gut erkennbar ist. Die Proben wurden mit einem primären Maus- $\alpha$ -M45 Antikörper und einem sekundären  $\alpha$ -Maus Cy3-Konjugat sowie mit DAPI gefärbt. Zweite Bildspalte: Phasenkontrast. Dritte Bildspalte: DAPI-Fluoreszenz desselben Bildausschnittes.

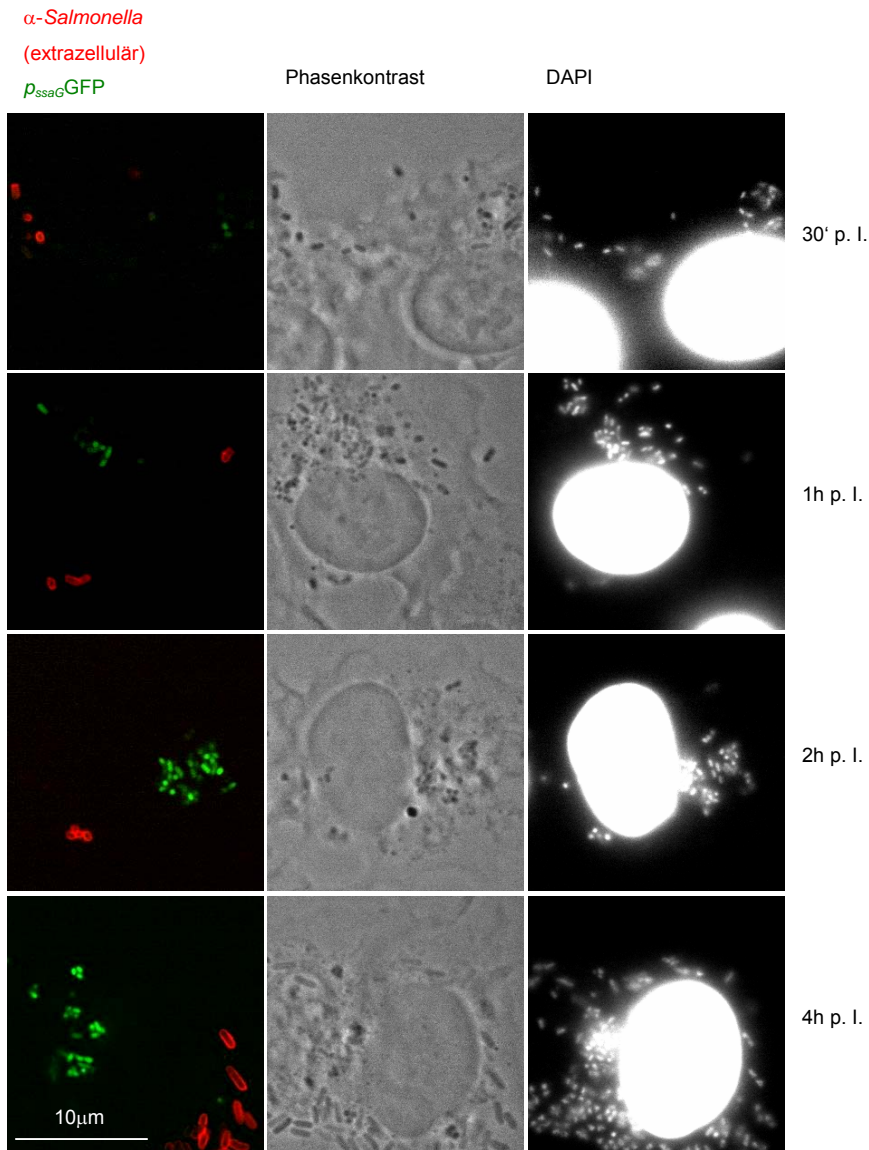


**Abb. 7 \*** Semiquantitative Auswertung der Cy3 (SipA<sub>M45</sub>)- und GFP (SPI-2 Induktion)-Fluoreszenz und deren Koloaliation bei der Infektion von COS7-Zellen mit *Salmonella* Typhimurium M1300 pM973. In jeweils 20-30 infizierten Zellen wurde der Anteil von *p<sub>ssaG</sub>*-GFP exprimierenden und der mit Cy3-Fluoreszenz (SipA<sub>M45</sub>) koloalysierenden Bakterien bestimmt. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung unter den 20-30 analysierten Zellen innerhalb eines Zeitpunkts.

### 5.1.2 Charakterisierung des $p_{ssaG}$ -GFP-Reporterkonstrukts

Da sich die Färbung von SPI-2-Effektorproteinen zu frühen Zeitpunkten als problematisch erwies, war es notwendig, die GFP-Expression des Reporterplasmids pM973 genauer zu charakterisieren. Es wäre beispielsweise denkbar gewesen, dass das GFP-Expressionsverhalten durch die im Vergleich zum Chromosom erhöhte Kopienzahl beeinflusst wurde.

In einem ersten Zellkulturinfektionsexperiment wurde deshalb untersucht, ob  $p_{ssaG}$ -GFP nur von intrazellulären Bakterien exprimiert wird. Das Experiment wurde bis zur Fixierung mit demselben Stamm (M1300 pM973) und unter denselben Bedingungen durchgeführt wie unter 5.1.1 beschrieben. Danach wurde statt der Färbung gegen SipA<sub>M45</sub> eine Färbung durchgeführt, welche alle Bakterien, die sich nicht innerhalb der COS7-Zellen befanden, erfasste. Dies wurde erreicht, indem vor der Membranpermeabilisierung mit TritonX 100 eine  $\alpha$ -*Salmonella*-Immunfärbung durchgeführt wurde. Bei dem Experiment wurde beobachtet, dass keinerlei Bakterien, welche sich ausserhalb der Zellen befanden, das Reporterkonstrukt exprimierten (Abb. 8).



**Abb. 8** Vergleich der  $p_{ssuG}$ -GFP-Expression mit einer Färbung von extrazellulären M1300 pM973 bei der Infektion von COS7-Zellen. Links: Die Bakterien wurden vor der Membranpermeabilisierung mit einem Kaninchen- $\alpha$ -*Salmonella*-Antiserum und einem sekundären  $\alpha$ -Kaninchen-TRITC-Konjugat (rot) gefärbt, so dass nur extrazelluläre Bakterien von der Färbung erfasst wurden. Obwohl pro Zeitpunkt 100-200 extrazelluläre Bakterien analysiert wurden, konnten keine extrazellulären,  $p_{ssuG}$ -GFP-exprimierenden Bakterien nachgewiesen werden. Mitte: Phasenkontrastaufnahme. Rechts: DAPI-Färbung desselben Bildausschnittes.

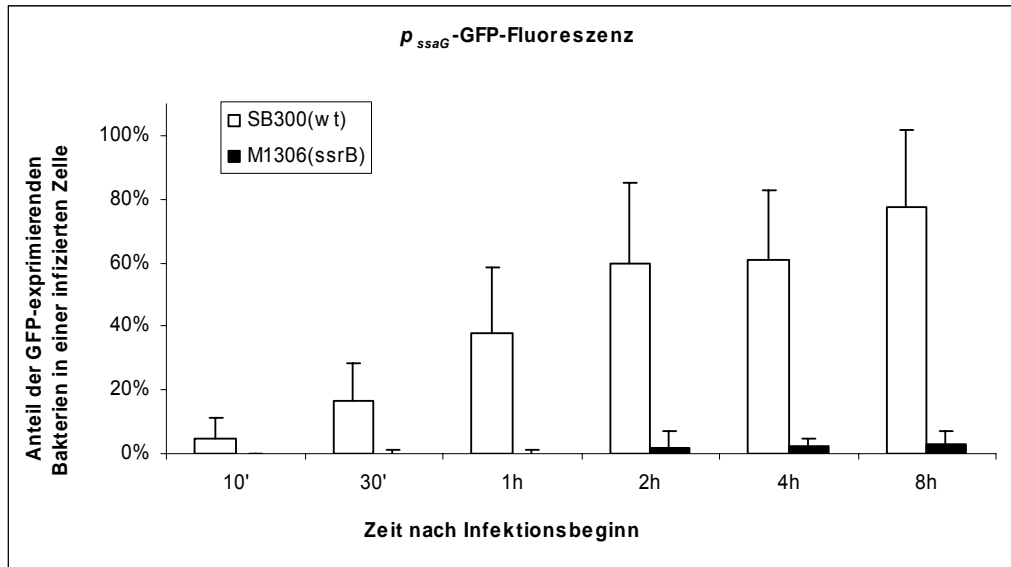
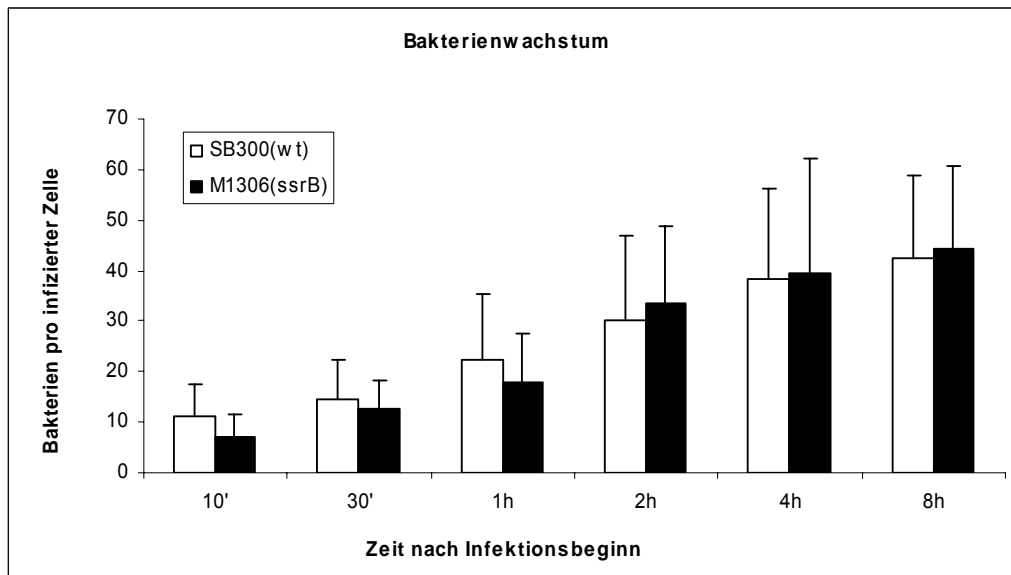
Um zu testen, ob das plasmidcodierte GFP-Reporterkonstrukt genau wie der chromosomale Locus reguliert und exprimiert wird, wurde der Verlauf der  $p_{ssaG}$ -Expression von pM973 im Wildtyp SB300 mit der Expression in einer *ssrB*-Mutante (M1306) mit gleichem Stammhintergrund verglichen. *ssrB* codiert für den „response regulator“ eines Zweikomponentensystems, das für die Expression von allen SPI-2 Genen absolut notwendig ist (Deiwick, Nikolaus et al. 1999). Bei einem GFP-Reporterkonstrukt unter strenger SPI-2-Kontrolle sollte folglich in einer *ssrB*-Mutante keine GFP-Expression nachweisbar sein.

Mit den beiden Stämmen wurde ein Zellkulturinfektionsexperiment durchgeführt wie unter 5.1.1 beschrieben. Auf eine Immunfluoreszenzfärbung wurde aber dabei verzichtet. Es wurde lediglich die DNA mit DAPI gefärbt. Die Präparate wurden auf dieselbe Weise bezüglich GFP-exprimierender Bakterien ausgewertet wie unter 5.1.1 aufgeführt. Es zeigte sich, dass innerhalb des betrachteten Zeitraums von 8h bei der *ssrB*-Mutante keine  $p_{ssaG}$ -GFP-Expression zu beobachten war. Die Positivkontrolle mit dem Wildtypstamm (SB300 pM973) zeigte jedoch wie unter 5.1.1 beschrieben eine Zunahme der GFP-Fluoreszenz über den beobachteten Zeitraum.

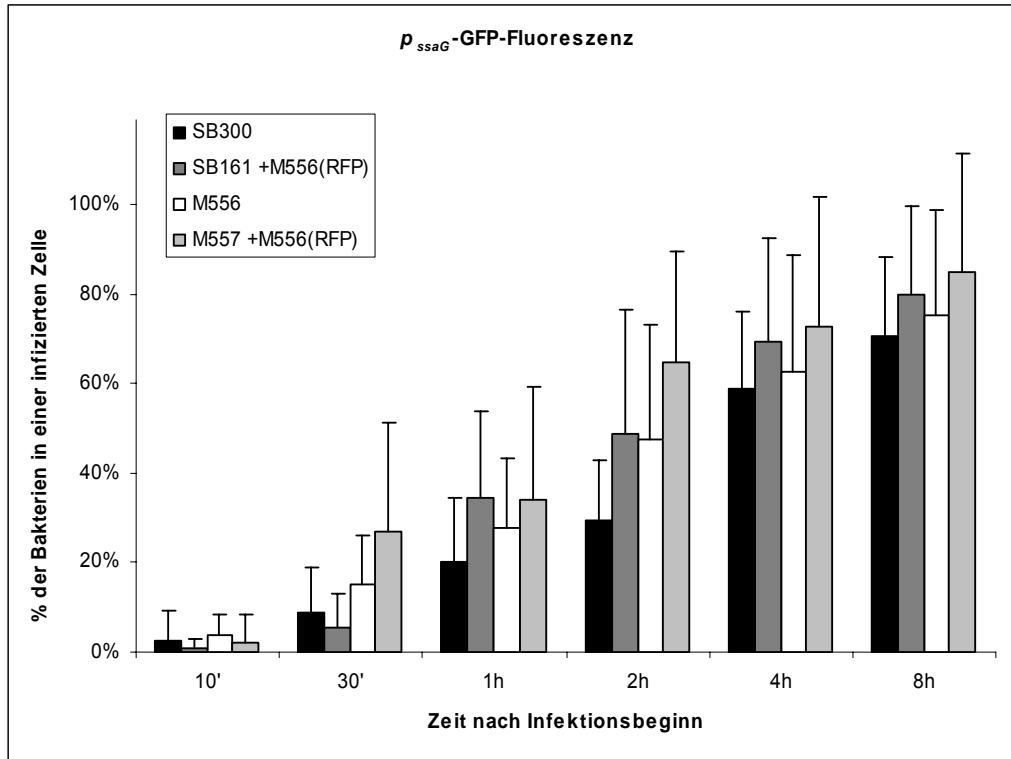
Das Ausbleiben der GFP-Expression bei M1306 pM973 scheint nicht damit zusammenzuhängen, dass es sich bei M1306 um eine SPI-2-defiziente Mutante handelt. Bei der Bestimmung der Bakterienzahl pro infizierter Zelle wurde festgestellt, dass sich M1306 innerhalb von 8h Infektionsdauer genauso vermehrt wie der Wildtyp SB300. Das Fehlen von GFP in M1306 ist deswegen wahrscheinlich nicht auf geringere Lebensfähigkeit der Bakterien innerhalb der infizierten Zellen zu dieser relativ frühen Infektionsphase zurückzuführen (Abb. 9).

Schliesslich wurde das Reporterplasmid in verschiedenen SPI-1- und SPI-2-Sekretionsmutanten von *Salmonella* Typhimurium getestet. Der Verlauf der  $p_{ssaG}$ -GFP-Expression von pM973 wurde in den Stämmen SB161 (SPI-1-Sekretionsmutante), M556 (SPI-2-Sekretionsmutante) und M557 (SPI-1/2-Sekretionsdoppelmutante) untersucht und mit dem Wildtyp (SB300) verglichen. Es wurden COS7-Zellen mit 3µl SPI-1-induzierter Bakterienkultur infiziert. Da die SPI-1 Mutanten SB161 und M557 invasionsdefizient sind, wurden sie mit dem Helferstamm M556 pCJLA-RFPexp coinfiziert. Der Helferstamm M556 pCJLA-RFPexp war durch das auf dem Plasmid codierte rotfluoreszierende Protein (RFP) von den untersuchten Stämmen SB161 pM973 bzw. M557 pM973 zu unterscheiden und wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Das Infektionsexperiment wurde unter denselben Bedingungen durchgeführt wie unter 5.1.1 beschrieben. Auf eine Immunfluoreszenzfärbung wurde aber dabei verzichtet und lediglich die DNA mit DAPI gefärbt. Die Präparate wurden auf dieselbe Weise bezüglich GFP-exprimierender Bakterien ausgewertet wie unter 5.1.1 aufgeführt. Zu den betrachteten Zeitpunkten bis 8h nach Infektionsbeginn liess sich bei den untersuchten Mutanten kein Unterschied zwischen der  $p_{ssaG}$ -GFP-Expression des Wildtypstammes und der Mutanten nachweisen (Abb. 10).



**A****B**

**Abb. 9 A:** Expression von  $p_{ssaG}$ -GFP, Vergleich einer SPI-2-Regulationsmutante (M1306 pM973) mit dem Wildtyp (SB300 pM973) bei der Infektion von COS7-Zellen. Die *ssrB*-Mutante zeigt bei vergleichbarem Wachstum (**B**) in den Zellen keine deutliche GFP-Expression, wie dies im Wildtyp zu beobachten ist. Es wurden pro Zeitpunkt und Stamm 20 infizierte Zellen auf GFP-exprimierende Bakterien hin untersucht. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung zwischen den Bakterienzahlen der untersuchten infizierten Zellen.



**Abb. 10** Verhalten des  $p_{ssaG}$ -GFP-Reporterkonstrukts in verschiedenen SPI-1/2-Sekretionsmutanten von *Salmonella* Typhimurium. COS7-Zellen wurden mit den entsprechenden pM973 enthaltenden Mutanten infiziert und der Anteil der GFP-exprimierenden Bakterien in infizierten Zellen bestimmt. Im Fall von SB161 pM973 und M557 pM973 wurden die Bakterien mit demselben Volumen (3  $\mu$ l) einer Kultur von M556 pCJLA-RFPexp coinfiziert. Die rot fluoreszierenden Bakterien wurden nicht mitbewertet. Gezeigt ist die Auswertung von 10-20 infizierten COS7-Zellen pro Zeitpunkt und Mutante. Fehlerbalken markieren die Standardabweichung zwischen den Bakterienzahlen der untersuchten infizierten Zellen. Die Mutanten zeigen einen vergleichbaren Verlauf der  $p_{ssaG}$ -GFP-Expression wie der Wildtyp (SB300 pM973).

## 5.2 Wirtszellkontakt und SPI-1-abhängige Prozesse

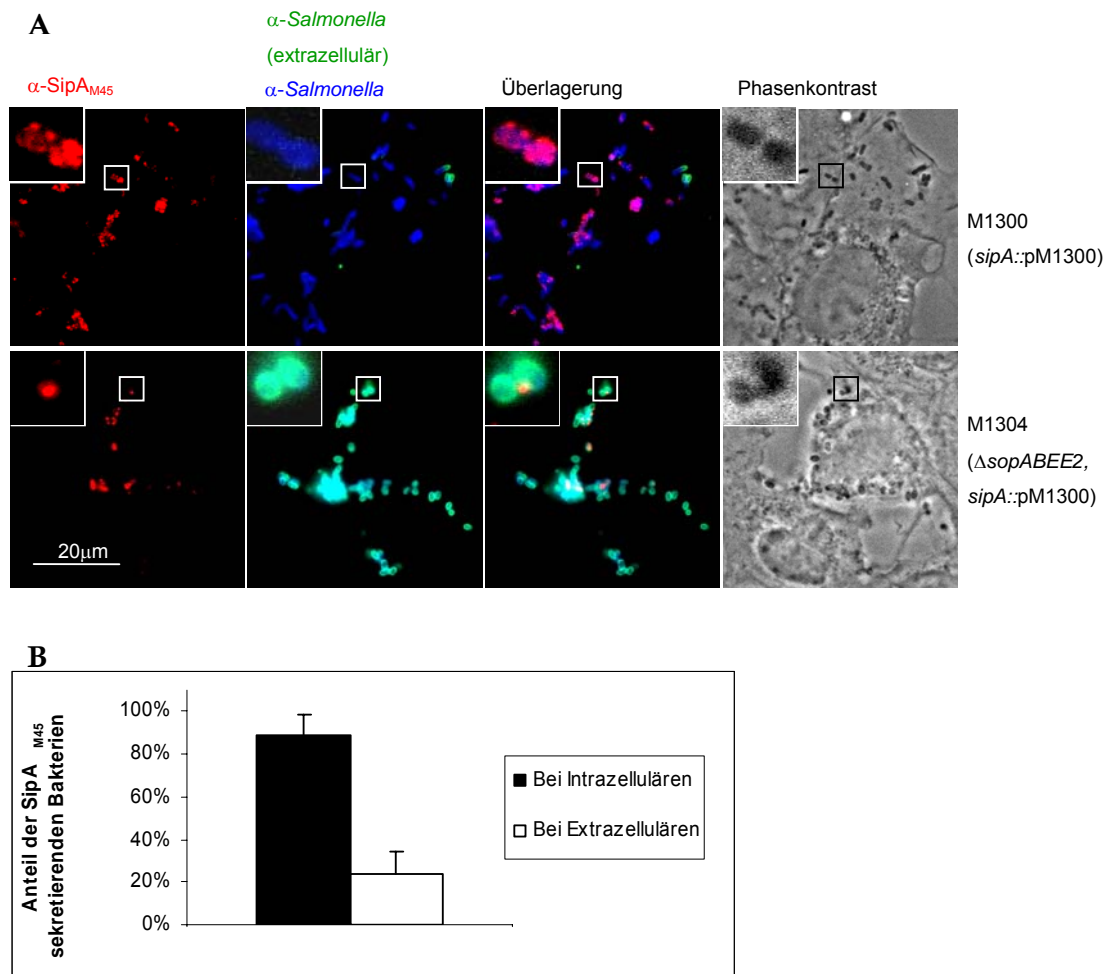
### 5.2.1 \* Zusammenhang von SipA-Sekretion und Invasion

Aufgrund der Bedeutung von Typ III Sekretionssystemen in der Pathogenese stellt sich die Frage, wie die Sekretion dieser Systeme reguliert wird, im Speziellen, ob sie durch Kontakt mit dem Wirt aktiviert werden kann (Hueck 1998). Für TTSS anderer Spezies wurde schon gezeigt, dass die Sekretion bzw. Translokation erst nach Kontakt mit einer Wirtszelle aktiviert wird (Persson, Nordfelth et al. 1995; Watarai, Tobe et al. 1995). Bei *Salmonella* Typhimurium hingegen befasste sich mit dem Nachweis zellkontaktabhängiger Sekretion lediglich eine frühe Arbeit über InvJ, welches man damals für ein Effektorprotein hielt (Zierler and Galan 1995). Gemäss neueren Untersuchungen ist InvJ aber am Aufbau des Nadelkomplexes beteiligt (Kubori, Sukhan et al. 2000). Es ist aber nach wie vor unklar, ob die Expression von SPI-1 Effektorproteinen oder ihre Sekretion bzw. Translokation über das SPI-1 TTSS durch den Wirtszellkontakt erhöht werden kann. Im zweiten Teilprojekt der vorliegenden Arbeit sollten deshalb solche Induktionsvorgänge exemplarisch am SPI-1 Effektorprotein SipA untersucht werden.

Um die Sekretion von SipA und die Invasion von *Salmonella* Typhimurium frühen Zeitpunkten der Infektion zu untersuchen, wurden mit *Salmonella* Typhimurium M1300 Zellkulturinfektionsexperimente durchgeführt. Dieser Stamm codiert chromosomal für M45-markiertes SipA. Beim ersten Versuch wurden COS7-Zellen für 1h mit M1300 infiziert. Anschliessend wurden die Zellen gemäss 4.9.3 fixiert und eine  $\alpha$ -M45-Färbung mit einer Färbung extrazellulärer Bakterien (5.1.2) kombiniert. Mit dieser Methode konnte SipA<sub>M45</sub> nachgewiesen werden, das von den Bakterien sekretiert oder transloziert worden war. SipA<sub>M45</sub> im bakteriellen Zytoplasma lässt sich mit der verwendeten Technik aufgrund der Beschaffenheit der Hülle von gramnegativen Bakterien nicht vollständig anfärben.

Zur Auswertung wurden je 200 extrazelluläre und 200 intrazelluläre Bakterien pro Zeitpunkt auf die Anwesenheit von SipA<sub>M45</sub> hin untersucht. Dabei war in der unmittelbaren Umgebung der meisten intrazellulären Bakterien SipA<sub>M45</sub> nachweisbar. Bei extrazellulären Bakterien wurde in rund 75% aller Fälle kein SipA<sub>M45</sub> beobachtet (Abb. 11). Ausserdem unterschied sich die Verteilung von SipA<sub>M45</sub> bei intrazellulären und extrazellulären Bakterien: Bei letzteren war SipA<sub>M45</sub>, wenn überhaupt, punktförmig und eher auf einer Seite der Bakterien polarisiert zu beobachten, während es bei intrazellulären *Salmonella* Typhimurium wolkenartig um das Bakterium verteilt zu sein schien. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vermutet, dass die Bakterien nach Zellkontakt bzw. während der Zellinvasion vermehrt SipA<sub>M45</sub> translozieren.

In einem zweiten Experiment sollte untersucht werden, ob die Invasion in Wirtszellen notwendig ist, um die beobachtete Translokation grosser Mengen von SipA<sub>M45</sub> in die Umgebung des Bakteriums auszulösen. Für die Versuche wurde die nicht invasive Mutante M1304 (*sipA::pM1300*,  $\Delta$ *sopABEE2*) eingesetzt. Diese Mutante bindet zwar noch effizient an COS7-Zellen und kann Effektorproteine translozieren, doch fehlen ihr die Proteine SopE, SopE2 und SopB, welche für die Invasion essentiell sind (siehe Tab. 1). Nach Infektion von COS7-Zellen mit M1304 war fast ausschliesslich die punktförmige, polarisierte Lokalisierung des SipA<sub>M45</sub> zu beobachten (Abb. 11). Diese Beobachtungen liessen die Vermutung zu, dass die starke, mit Immunfluoreszenz nachweisbare SipA-Sekretion erst mit dem Wirtszellkontakt oder gar mit der Invasion der Bakterien beginnt. In den Experimenten liessen sich aber keine Aussagen über SipA<sub>M45</sub> im bakteriellen Zytoplasma machen, da bei der verwendeten Färbemethode (4.9.3) das Zytoplasma extrazellulärer Bakterien nicht für eine Immunfluoreszenzfärbung zugänglich war.



**Abb. 11** \* SipA<sub>M45</sub>-Sekretion bei invasiven und nicht invasiven Bakterien während der Infektion von COS7-Zellen. **A:** Vergleich der Sekretion des Wildtypstammes M1300 mit der nicht invasiven Mutante M1304 eine Stunde nach der Infektion von COS7-Zellen. Rot:  $\alpha$ SipA<sub>M45</sub>/α-Maus-Cy3, grün:  $\alpha$ -*Salmonella* (extrazellulär)/α-Kaninchen-FITC, blau:  $\alpha$ -*Salmonella* (alle)/ α-Kaninchen-AMCA. Obere Reihe: Wildtyp,

*sipA::pM1300*. Untere Reihe: Invasionsdefiziente Mutante, *sipA::pM1300*. Extrazelluläre Bakterien sekretieren möglicherweise weniger häufig SipA<sub>M45</sub> und das sekretierte Protein ist stark an einem Punkt lokalisiert. **B:** Semiquantitative Bewertung von 200 intrazellulären und 200 extrazellulären Bakterien bezüglich der Anwesenheit von sekretiertem SipA<sub>M45</sub> bei M1300, 1h nach Infektion von COS7-Zellen. Sekretiertes SipA<sub>M45</sub> wurde dabei häufiger bei internalisierten (schwarzer Balken) als bei extrazellulären Bakterien (weisser Balken) beobachtet. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

### 5.2.2 Permeabilisierung der bakteriellen Zellwand

Um den Sekretionsweg von SipA<sub>M45</sub> während der Infektion von COS7-Zellen besser verfolgen zu können, wurde ein Weg gesucht, das bakterielle Zytoplasma für eine Immunfluoreszenzfärbung zugänglich zu machen. Eine Permeabilisierung des Peptidoglycans der Bakterienhülle für Immunfluoreszenzfärbung mit Lysozym wurde in *Legionella pneumophila* gezeigt (Watarai, Andrews et al. 2001). Ausgehend von diesen Bedingungen wurde ein Lysozymverdau für *Salmonella* Typhimurium entwickelt (siehe 4.8).

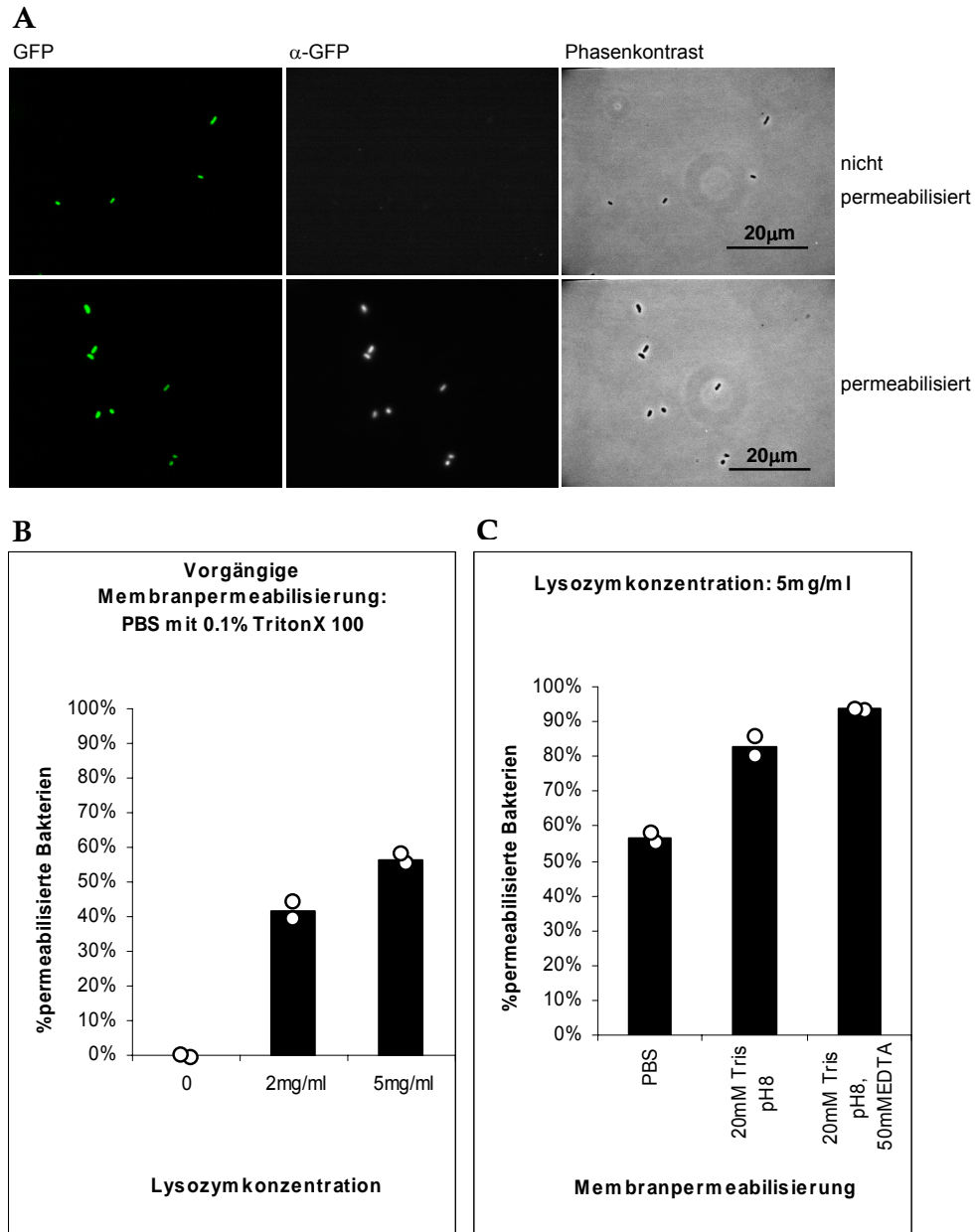
Eine wichtige Voraussetzung für die Versuche war die Wahl eines geeigneten Kontrollproteins. Ein solches Protein sollte idealerweise auch ohne Färbung im Mikroskop sichtbar sein, ausserdem sollte ein spezifischer Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung dieses Proteins zur Verfügung stehen. Aufgrund dieser Überlegungen fiel die Wahl auf das GFP. Der Wildtypstamm M1300 wurde mit einem Expressionsvektor (pM979) transformiert, der für GFP unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors codierte. Die Arbeitsgruppe von Prof. R. Glockshuber (Institut für Molekularbiologie, ETH Zürich) hat freundlicherweise ein hochspezifisches  $\alpha$ -GFP-Antiserum zur Verfügung gestellt.

Anhand einer Immunfluoreszenzfärbung gegen GFP in einem konstitutiv GFP exprimierenden *Salmonella* Stamm (M1300 pM979) wurde die Effizienz der Permeabilisation optimiert: Die GFP-Fluoreszenz war dabei unabhängig von der Permeabilisierung in allen Bakterien nachweisbar. Im Gegensatz dazu war die  $\alpha$ -GFP-Färbung von der Effizienz der Permeabilisierung abhängig. Diese Permeabilisierungseffizienz ergab sich aus dem Verhältnis der Bakterien, bei welchen die  $\alpha$ -GFP-Färbung mit GFP kolokalisiert war, zur Gesamtzahl der GFP-exprimierenden Bakterien (grüne GFP-Fluoreszenz) (Abb. 12). Es wurden verschiedene Bedingungen für die Membranpermeabilisierung mit TritonX 100 sowie einen nachfolgenden Verdau mit Lysozym getestet (Abb. 12).

Es zeigte sich, dass die vorgängige Permeabilisierung der Membranen, welche sich offensichtlich unter hohen Konzentrationen von EDTA effizienter gestaltet (Abb. 12), ähnlich wichtig ist wie der Lysozymverdau selbst. Ausserdem wurde eine bessere Erhaltung der Präparate festgestellt, wenn die Fixierung vor der Permeabilisierung der Bakterienzellwand 30min bei Raumtemperatur

durchgeführt wurde statt 1h bei 4°C (Daten nicht gezeigt). Durch das optimierte Protokoll (siehe 4.9.4) konnte eine Permeabilisierungseffizienz von 95% erreicht werden, ca. 5% der Bakterien konnten nicht ausreichend permeabilisiert werden, um den Immunfluoreszenznachweis von GFP zu ermöglichen. In allen folgenden Experimenten, bei welchen der Lysozymverdau zur Anwendung kam, wurde deshalb die  $\alpha$ -GFP-Färbung als interne Kontrolle für die vollständige Permeabilisierung verwendet. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass die Menge an intrabakteriellem SipA<sub>M45</sub> nur bei effizient permeabilisierten Bakterien beurteilt wurde.

Zur Etablierung des neuen Färbeprotokolls für intrabakterielles SipA<sub>M45</sub> war es notwendig, die Bakterien in Abwesenheit von COS7-Zellen auf Deckgläsern zu immobilisieren. Gelatinevorbehandelte Mikroskopierdeckgläser (4.7) erlaubten diese Immobilisierung von *Salmonella* Typhimurium. Die späteren Analysen bestätigten, dass dieses Immobilisierungsprotokoll keinen Einfluss auf die Sekretion bzw. Translokation von Effektorproteinen hatte.



**Abb. 12** Optimierung der vollständigen Permeabilisierung von Bakterien. **A:** Beispiel von nicht permeabilisierten sowie effizient permeabilisierten Bakterien. Für die Analyse wurden die Bakterien (M1300 pM979) auf gelatinevorbehandelten Mikroskopierdeckgläsern immobilisiert. Die Bakterien wurden nach der Fixierung (1h bei 4°C mit 4% Paraformaldehyd in PBS) und Membranpermeabilisierung mit 0.1% TritonX 100 in PBS für 1h mit 5g/l Lysozym bzw. ohne Lysozym inkubiert.

**B:** Abhängigkeit der Permeabilisation von der Lysozymkonzentration bei gleicher vorgängiger Membranpermeabilisierung (5min bei Raumtemperatur in 0.1% TritonX100 in PBS). **C:** Abhängigkeit der Permeabilisierung von der vorgängigen Membranpermeabilisierung mit 0.1% TritonX 100 in unterschiedlichen Puffern bei gleicher Lysozymkonzentration im nachfolgenden Verdau. Pro Bedingung wurden 200 GFP enthaltende Bakterien bezüglich der  $\alpha$ -GFP-Färbung mit einem Kaninchenantiserum und einem sekundären  $\alpha$ -Kaninchen-AMCA-Konjugat bewertet. Gezeigt sind bei beiden Grafiken die Daten aus zwei parallelen Versuchsansätzen (Kreise) und ihre Mittelwerte (Balken).

### 5.2.3 Heterogenität der SipA-Expression in SPI-1-induzierten Bakterienkulturen

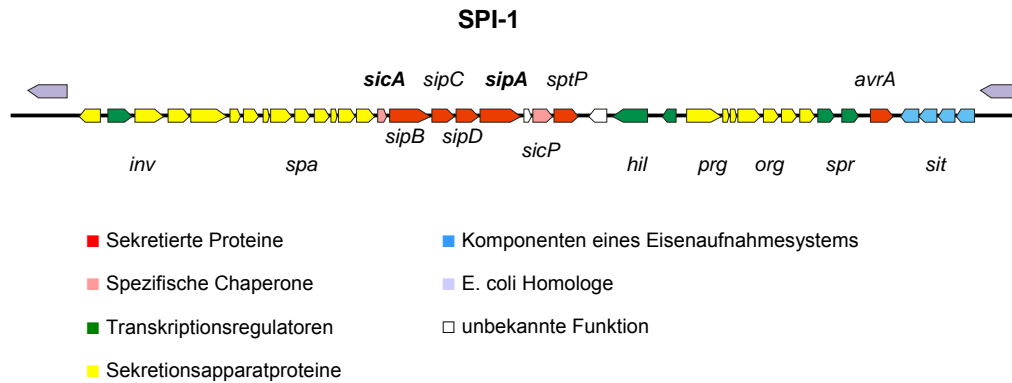
Im nächsten Schritt sollte das optimierte Permeabilisierungsprotokoll eingesetzt werden, um die Expression von SipA<sub>M45</sub> in Bakterien nachzuweisen. Zu den Wachstumsbedingungen, welche zur Expression von SPI-1 in Bakterienkulturen beitragen, gehören mikroaerophile Bedingungen und eine erhöhte NaCl-Konzentration (Lucas and Lee 2000; Phoebe Lostroh and Lee 2001). Nach der Permeabilisierung von „optimal“ induzierten Kulturen (siehe 4.5) des Wildtypstammes M1300 auf gelatinevorbehandelten Mikroskopierdeckgläsern (siehe 4.7) war SipA<sub>M45</sub> trotz des optimierten Permeabilisierungsprotokolls lediglich bei etwa 10% aller Bakterien nachweisbar.

Für dieses Phänomen kamen verschiedene Erklärungen in Betracht: Beispielsweise war es denkbar, dass das Protokoll, das für den Nachweis (grosser Mengen) von GFP optimiert worden war, nicht für den Nachweis von SipA<sub>M45</sub> geeignet war. Auch eine unterschiedliche Expression von SipA<sub>M45</sub> in den einzelnen Bakterien konnte dem beobachteten Phänomen zugrunde liegen.

Um diese Hypothesen zu überprüfen, wurden Experimente mit dem Reporterplasmid pM972 durchgeführt. Dieses Plasmid exprimiert GFP unter der Kontrolle des *sicA*-Promotors. *sicA*, nach dem der Promotor benannt ist, befindet sich im selben Operon wie *sipA* (Abb. 13) und ist an der SPI-1-abhängigen Typ III Sekretion beteiligt (Tucker and Galan 2000). Eine „SPI-1-induzierte“ Kultur von M1300 pM972 wurde für 20min auf gelatinevorbehandelten Mikroskopierdeckgläsern inkubiert, fixiert, mit Lysozym permeabilisiert und mittels  $\alpha$ -M45- und  $\alpha$ -GFP-Antikörpern gefärbt (siehe 4.9.4). Dabei wurde beobachtet, dass ungefähr 10% von M1300 pM972 stark GFP exprimierten (Abb. 14). SipA<sub>M45</sub> konnte in bis zu 90% der stark GFP exprimierenden Bakterien nachgewiesen werden (Abb. 14).

Als Kontrolle diente ein paralleles Experiment mit M1300 pM965. Das Plasmid pM965 codiert GFP unter der Kontrolle des *rpsM*-Promotors. *rpsM* ist das Gen für das ribosomale Protein S13 (Post, Arfsten et al. 1980) und ist in der exponentiellen Phase, in welcher sich SPI-1-induzierte Kulturen befinden, konstitutiv exprimiert. In der Kultur von M1300 pM965 wurde GFP von über 95% der Bakterien exprimiert, SipA<sub>M45</sub> war wiederum bei etwa 10% der Bakterien nachweisbar (Abb. 14). Die interne Kontrollfärbung mit dem  $\alpha$ -GFP-Antikörper zeigte, dass auch nicht *mangelnde* Permeabilisierung der Grund für den kleinen Anteil an SipA<sub>M45</sub> enthaltenden Bakterien war: In allen Experimenten korrelierte die Intensität der  $\alpha$ -GFP-Färbung genau mit der GFP-Fluoreszenz (Abb. 14).





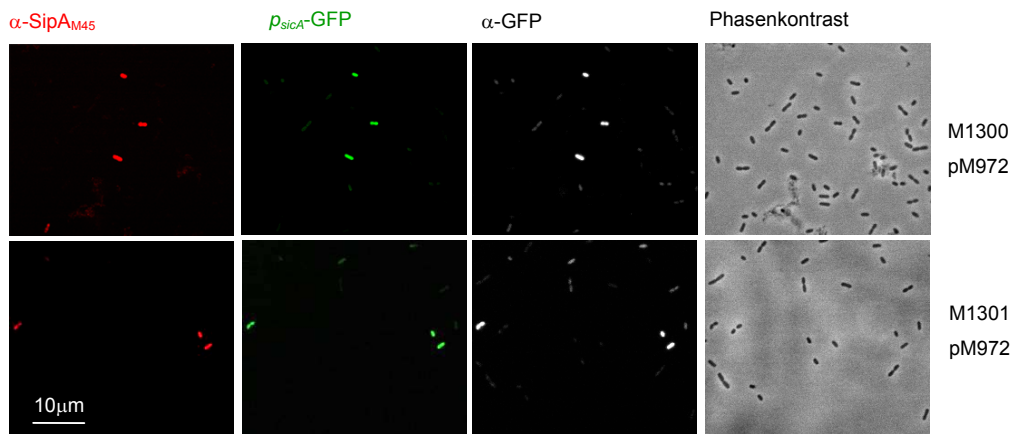
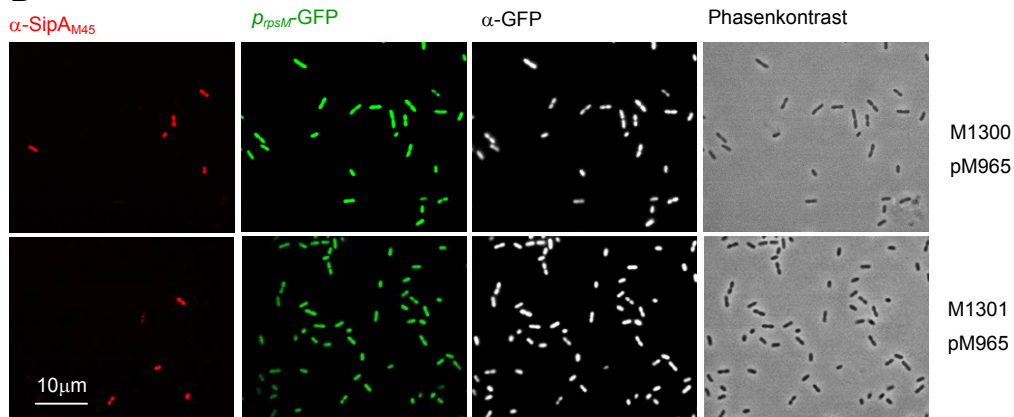
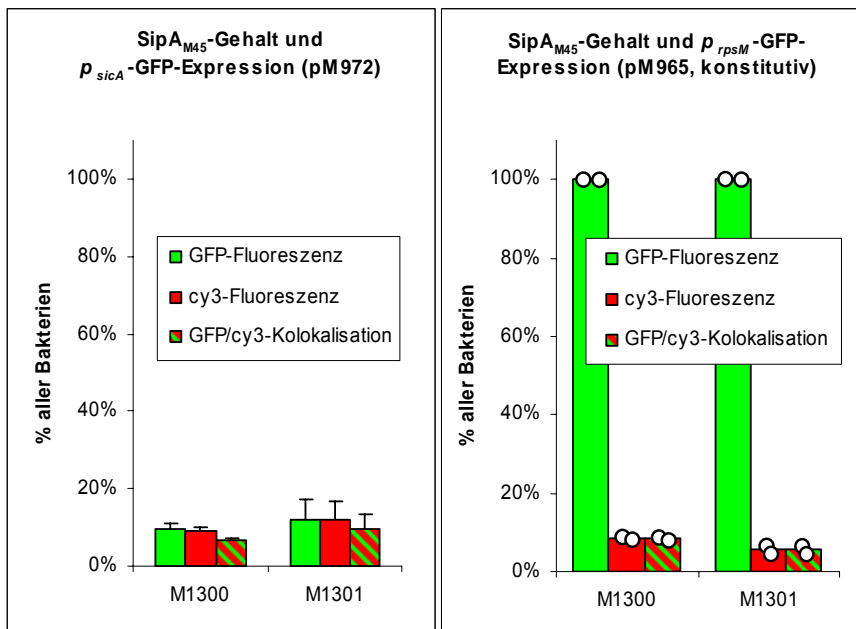
**Abb. 13** Karte der Salmonella Pathogenitätsinsel 1. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Effektorprotein SipA liegt im Operon, dessen Transkription unter der Kontrolle des Promotors von *sicA*, einem Gen für ein Chaperon der Typ III Sekretion, steht. Von den übrigen Genen sind lediglich die Operons bezeichnet. Vereinfacht nach (Hansen-Wester and Hensel 2001).

Um zu prüfen, ob SipA<sub>M45</sub> von den Bakterien ins Medium sekretiert wurde und deswegen nicht nachweisbar war, wurde dasselbe Experiment mit einer SPI-1-induzierten Kultur von M1301 pM965 bzw. pM972 durchgeführt. M1301 ist SPI-1 sekretionsdefizient und sollte deshalb SipA<sub>M45</sub> nicht verlieren. In diesem Experiment war SipA<sub>M45</sub> wiederum nur in etwa 10% der Bakterien nachweisbar, und die Kolo-kalisation von SipA<sub>M45</sub> und *p<sub>sicA</sub>*-GFP war im Fall von M1301 pM972 vergleichbar mit M1300 pM972 (Abb. 14). Diese Daten belegen, dass nur ein kleiner Prozentsatz der Bakterien in einer „induzierten“ Kultur in nachweisbaren Mengen SipA<sub>M45</sub> exprimieren. Dieser Prozentsatz hängt nicht von der Fähigkeit des Bakteriums ab, Effektorproteine mit Hilfe des SPI-1 TTSS zu sekretieren.

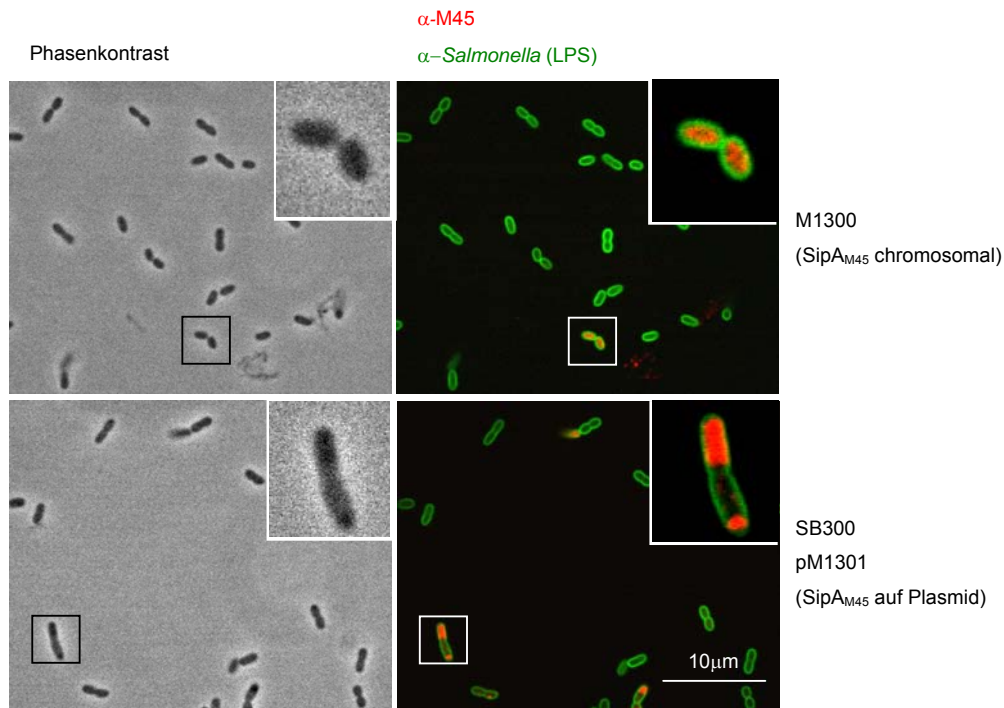
Bei Untersuchungen des SPI-1 Effektorproteins SopE wurde festgestellt, dass die SopE-Expression stark erhöht werden konnte, wenn Expressionsvektoren in hoher Kopienzahl verwendet wurden (A. Friebe, K. Ehrbar, W.-D. Hardt, nicht publiziert). So war es denkbar, dass der Prozentsatz von SipA<sub>M45</sub> exprimierenden Bakterien durch Verwendung eines ähnlichen Vektors hätte erhöht werden können. Hierfür wurde der Vektor pM1301 verwendet. Er zeichnet sich aus durch hohe Kopienzahl und codiert für SipA<sub>M45</sub> unter der Kontrolle des *sopE*-Promotors. Falls SipA<sub>M45</sub> aufgrund der schwachen Sensitivität der Immunfluoreszenzfärbung von M1300 bzw. M1301 in den meisten Bakterien nicht nachweisbar gewesen wäre, war zu vermuten, dass sich bei der Verwendung von pM1301 dieser Anteil durch Erhöhung der SipA<sub>M45</sub>-Kopienzahl vergrößern liesse. Dies war aber offensichtlich nicht der Fall: Gelatinevorbehandelte Mikroskopierdeckgläser wurden mit SB300 pM1301 inkubiert, fixiert, vollständig permeabilisiert und gegen SipA<sub>M45</sub> sowie LPS gefärbt. Es wurde jedoch kein nennenswert größerer Anteil an SipA<sub>M45</sub> enthaltenden Bakterien beobachtet als bei den als Kontrolle gleich behandelten Bakterien vom Stamm M1300. Die pM1301 tragenden Bakterien zeigten allerdings eine insgesamt erhöhte Menge an SipA<sub>M45</sub>

sowie eine intrabakterielle Anordnung des SipA<sub>M45</sub>, die auf Aggregate unlöslichen Proteins hindeutete (Abb. 15). SipA<sub>M45</sub> wurde also im Fall der Codierung auf einem Plasmid mit hoher Kopienzahl wiederum nur in einem Bruchteil der Bakterien exprimiert, dafür in unphysiologischen Mengen, welche sich nicht für weitere Experimente zu eignen schienen. Experimente mit den SPI-1-Sekretionsmutanten M1301 bzw. SB161 pM1301 durchgeführt ergaben identische Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

In den Experimenten konnte so kein Hinweis darauf gefunden werden, dass die Heterogenität von SPI-1-induzierten *Salmonella* Typhimurium-Kulturen bezüglich der  $p_{sicA}$ -GFP-Expression und des SipA<sub>M45</sub>-Gehalts ein Artefakt war. Aufgrund der guten Korrelation von  $p_{sicA}$ -GFP-Expression und SipA<sub>M45</sub>-Gehalt wurden in den folgenden Experimenten nur die Bakterien betrachtet, welche ihrer  $p_{sicA}$ -abhängigen GFP-Fluoreszenz zufolge SPI-1-codierte Gene stärker exprimierten. So sollte es trotz der heterogenen Expression gelingen, eine zellkontaktabhängige Induktion der Effektorproteintranslokation zu untersuchen.

**A****B****C**

**Abb. 14** (vorhergehende Seite) Analyse der Heterogenität der SipA<sub>M45</sub>-Expression. SPI-1-induzierte Bakterienkulturen wurden für 20min auf gelatinevorbehandelten Mikroskopierdeckgläsern inkubiert, danach fixiert, permeabilisiert (4.9.4) und gefärbt ( $\alpha$ -GFP/ $\alpha$ -Kaninchen-AMCA und  $\alpha$ -M45/ $\alpha$ -Maus-Cy3). **A, B:** Beispiele für die gleichzeitige Expression von SipA<sub>M45</sub> und GFP **A:** pM972 (*p<sub>sicA</sub>*-GFP). **B:** pM965 (*p<sub>psM</sub>*-GFP, konstitutiv). Ein Vergleich von M1300 und der SPI-1-sekretionsdefizienten Mutante M1301 zeigt, dass das Fehlen von nachweisbaren SipA<sub>M45</sub>-Mengen in den meisten Bakterien höchstwahrscheinlich nicht durch Sekretion zustande kommt. **C:** Semiquantitative Auswertung der Kolo-kalisation von cy3(SipA<sub>M45</sub>)- und GFP-Fluoreszenz. Es wurden pro Versuchsbedingung 500-1000 Bakterien bewertet. Der Versuch mit pM972 wurde zweimal, der Versuch mit pM965 einmal wiederholt. Gezeigt sind die Mittelwerte (Balken) aus den Versuchen mit Standardabweichung bzw. den einzelnen Werten (Kreise).



**Abb. 15** Vergleich der SipA<sub>M45</sub>-Produktion bei Codierung auf dem Chromosom unter nativem Promotor (M1300) oder auf einem Plasmid mit hoher Kopienzahl unter dem *sopE*-Promotor (pM1301). Gelatinevorbehandelte Mikroskopierdeckgläser wurden mit SPI-1-induzierten Bakterien inkubiert, danach fixiert, permeabilisiert (4.9.4) und gefärbt ( $\alpha$ -M45/ $\alpha$ -Maus-Cy3 und  $\alpha$ -Salmonella/ $\alpha$ -Kaninchen-FITC). Von den Bakterien, welche *sipA<sub>M45</sub>* auf dem Plasmid codieren, scheinen nicht mehr Bakterien grosse Mengen SipA<sub>M45</sub> (rot) zu enthalten als beim chromosomal M45-markierten Stamm (M1300). In jenen Bakterien der Kultur von SB300 pM1301, welche das Proteins enthalten, scheint es aber in so grossen Mengen produziert zu werden, dass es in inhomogenen Proteinaggregaten vorliegt.

#### 5.2.4 Wirtszellkontaktabhängige Translokation von SipA

Die unter 5.2.1 aufgeführten Resultate liessen vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen Wirtszellkontakt der Bakterien und der Translokation von SipA<sub>M45</sub> bestehen könnte. Mit der Immobilisierung von Bakterien auf gelatinevorbehandelten Mikroskopierdeckgläsern und einer effizienten Methode zum immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Effektorproteinen im bakteriellen Zytoplasma war es nun möglich, diese Hypothese zu überprüfen. Es war nun möglich, eine Kontaktabhängigkeit der Translokation von SipA bei der Infektion von COS7-Zellen anhand des Verlusts von SipA<sub>M45</sub> aus dem bakteriellen Zytoplasma nachzuweisen. Als Negativkontrolle konnten Bakterien verwendet werden, die auf gelatinevorbehandelten Mikroskopierdeckgläsern immobilisiert waren. Es wurde dabei eine SPI-1-induzierte Kultur vom Wildtypstamm M1300 pM972 (*p<sub>sicA</sub>*-GFP) verwendet.

Bei den folgenden Analysen hätte sich eine Neusynthese von Effektorproteinen nach dem Zellkontakt als störend erweisen können. Um eine solche Neusynthese von SipA<sub>M45</sub> zu verhindern, wurden Kontrollexperimente in Anwesenheit von 100µg/ml Chloramphenicol durchgeführt. Es ist gezeigt worden, dass die Proteinsynthese in *Salmonella* Typhimurium in Zellkulturmedium mit 100µg/ml Chloramphenicol unverzüglich inhibiert wird, die Bakterien aber mindestens eine halbe Stunde lang invasiv bleiben (MacBeth and Lee 1993). Ausserdem scheint die Lebensfähigkeit der Bakterien auch nach längerer Zeit unter den beschriebenen Bedingungen nicht stark beeinträchtigt zu werden. Dies wurde durch Ausplattieren der Bakterien nach verschiedenen Inkubationszeiten in HBSS mit und ohne Chloramphenicol festgestellt (Abb. 16).

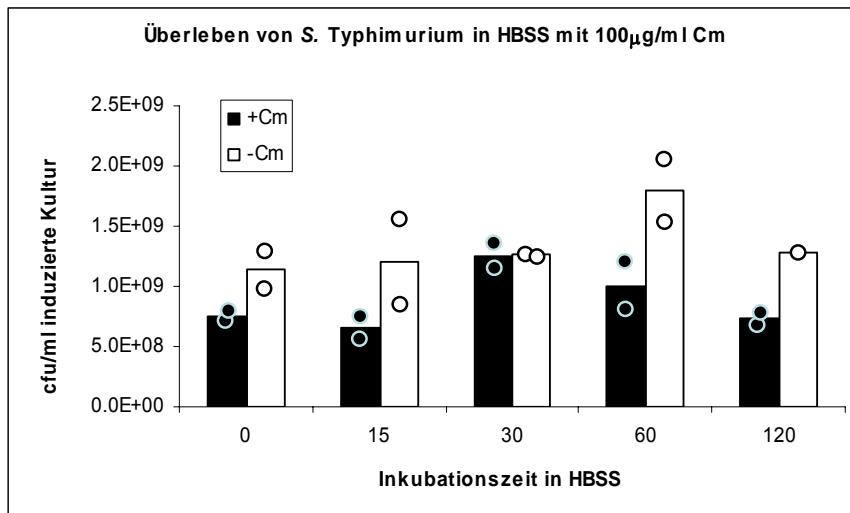
In Western Blot Analysen von SPI-1-induzierten Kulturen von M1300 war eine beträchtliche Menge SipA<sub>M45</sub> im Überstand beobachtet worden (Abb. 17). Diese offenbar unspezifische Sekretion von Effektorprotein ohne Zellkontakt musste von der durch Zellkontakt induzierten Translokation unterschieden werden. Dies geschah durch Vergleich der SipA<sub>M45</sub> Sekretionskinetik bei der eigentlichen Inkubation auf COS7-Zellen und bei Bakterien auf gelatinevorbehandelten Mikroskopierdeckgläsern. So konnte eine spontane Sekretion von SipA<sub>M45</sub> verfolgt und mit der zellkontaktinduzierten Translokation verglichen werden.

Der Stamm M1300 pM972 wurde unter SPI-1-induzierenden Bedingungen kultiviert. Die Bakterien wurden anschliessend gewaschen und in Anwesenheit und Abwesenheit von 100µg/ml Chloramphenicol auf COS7-Zellen oder auf gelatinevorbehandelte Mikroskopierdeckgläser gegeben. Nach 20min Inkubation wurden die Präparate gemäss 4.9.4 fixiert, permeabilisiert und danach α-SipA<sub>M45</sub> und α-GFP gefärbt.

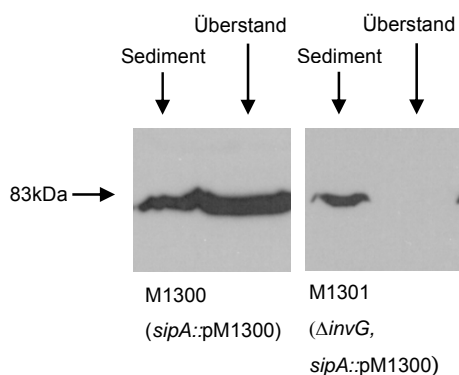
Die Analyse der An- oder Abwesenheit von SipA<sub>M45</sub> im bakteriellen Zytoplasma erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Von jeweils 200 stark *p<sub>sicA</sub>*-GFP exprimierenden Bakterien wurde der Anteil der SipA<sub>M45</sub> enthaltenden Bakterien bestimmt. Es wurde dabei beobachtet, dass SipA<sub>M45</sub> nach dem Transfer auf gelatinevorbehandelte Mikroskopierdeckgläser ein Vielfaches länger in den Bakterien verblieb als nach Kontakt mit Epithelzellen. Dort wurde es offenbar innert Minuten aus über 90% der stark *p<sub>sicA</sub>*-GFP-fluoreszierenden Bakterien transloziert (Abb. 19, als Beispiel ist in Abb. 18 der Vergleich der Experimente mit und ohne COS7-Zellen ohne eine Vorinkubation in

HBSS mit 100µg/ml Chloramphenicol gezeigt). Die Translokation verlief bis zu zehnmal schneller als der Verlust des Effektorproteins in der Abwesenheit von Wirtszellen (Abb. 19). Der starke Unterschied im Anteil der SipA<sub>M45</sub> enthaltenden Bakterien zwischen An- oder Abwesenheit von COS7-Zellen wurde in An- und Abwesenheit von Chloramphenicol beobachtet. Lediglich bei einer sehr langen Vorinkubationszeit in HBSS mit Chloramphenicol sank der Anteil der SipA<sub>M45</sub> enthaltenden Bakterien stärker als unter den entsprechenden Bedingungen ohne Chloramphenicol (Abb. 19). Durch die α-GFP-Färbung liess sich bei allen bewerteten Bakterien die Zugänglichkeit des bakteriellen Zytoplasmas für die Immunfluoreszenzfärbung überprüfen.

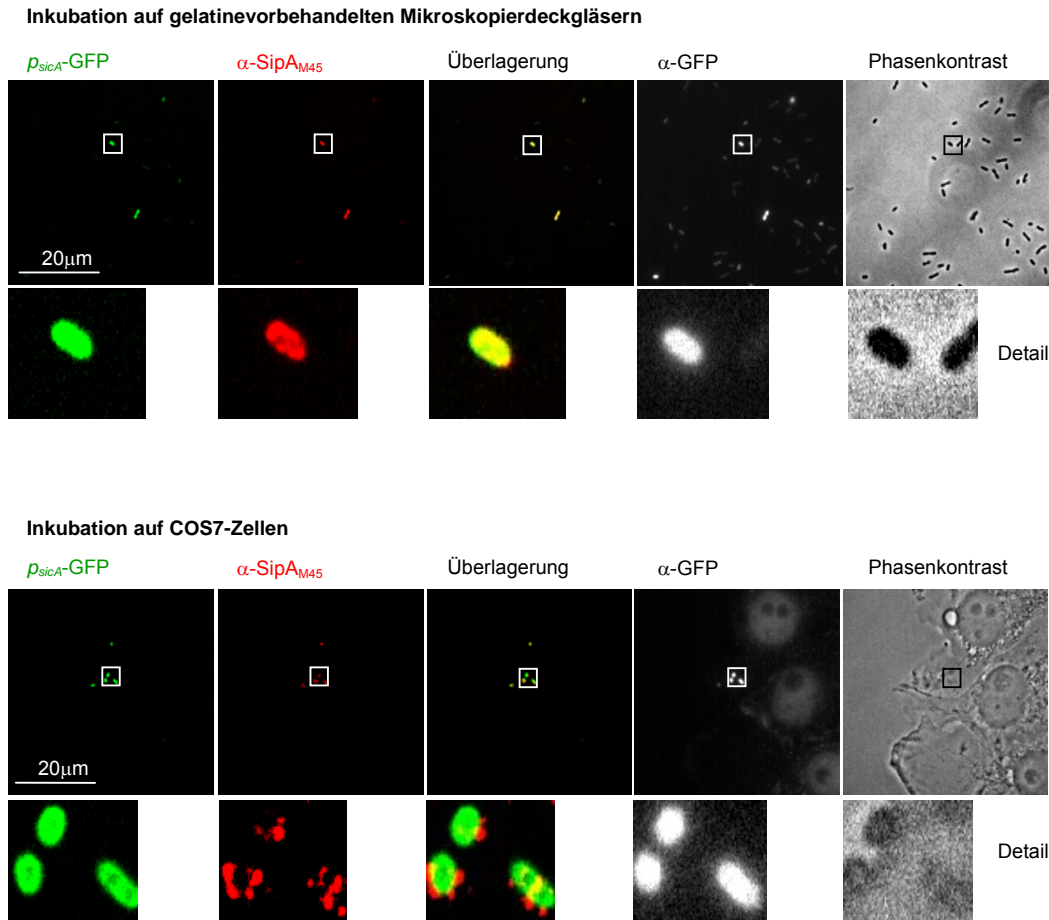
Des Weiteren wurden konfokale Bildstapel aufgenommen, um die beiden beobachteten Lokalisierungen von SipA<sub>M45</sub> in einer dreidimensionalen Rekonstruktion zu dokumentieren. Dabei wird der Unterschied zwischen einem Bakterium, welches SipA<sub>M45</sub> noch im Zytoplasma trägt und einem, welches SipA<sub>M45</sub> schon transloziert hat, besonders klar ersichtlich. COS7-Zellen wurden bei diesem Experiment für 10min mit 8µl einer SPI-1-induzierten Kultur von M1300 infiziert, gemäss 4.9.4 fixiert, permeabilisiert und mit α-M45- und α-LPS-Antikörpern gefärbt, um eindeutig zwischen dem Raum innerhalb und ausserhalb der bakteriellen äusseren Membran unterscheiden zu können. Mit einer Serie konfokal aufgenommener Bilder des Präparats konnte daraufhin eine dreidimensionale Ansicht der Bakterien und des SipA<sub>M45</sub> generiert werden (Abb. 20).



**Abb. 16** Überleben von *Salmonella* Typhimurium in HBSS mit Chloramphenicol. 0.5ml HBSS mit 100µg/ml Chloramphenicol wurden mit 8µl SPI-1 induzierter Kultur von M1300 pM972 beimpft und für die angegebene Zeit bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension zur Keimzahlbestimmung entsprechend verdünnt und auf LB-Agar mit Ampicillin, Tetracyclin und Streptomycin ausplattiert. Es sind kaum Unterschiede zwischen Kulturen mit und ohne Chloramphenicol oder über die Zeit festzustellen.

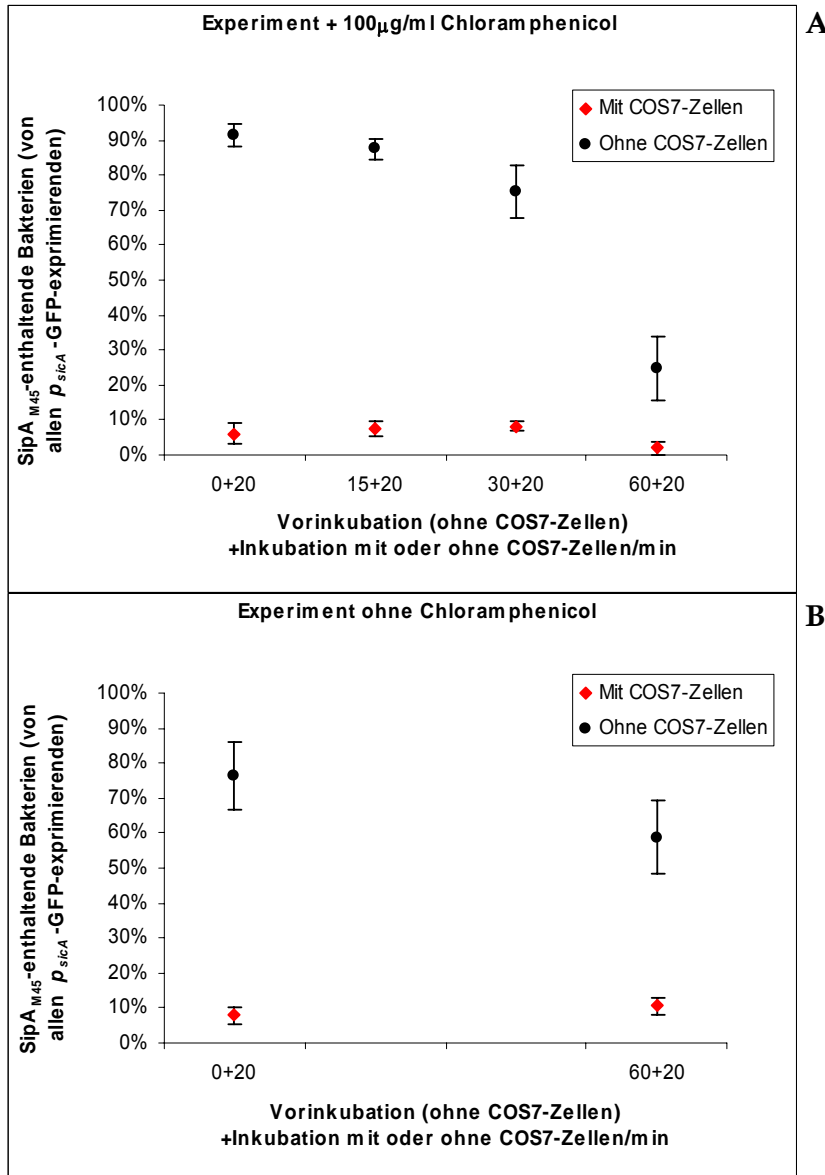


**Abb. 17** \* Western Blot Analyse der SPI-1-induzierten Kulturen von *Salmonella* Typhimurium mit M45-markiertem SipA. M1300 codiert chromosomal für SipA<sub>M45</sub> vor dem Wildtypstammhintergrund; M1301 ist die entsprechende SPI-1 sekretionsdefiziente Mutante. Von beiden Stämmen wurde das Sediment aus 0.5ml Kultur sowie die TCA-gefällten Proteine aus 1.5ml Kulturüberstand aufgetragen. Der Blot wurde mit einem monoklonalen α-M45-Antikörper und einem sekundären HRP-Konjugat inkubiert und gemäss 4.3.1 entwickelt. Bei M1300 ist ein beträchtlicher Teil von SipA<sub>M45</sub> im Überstand nachzuweisen, während das Protein bei M1301 offenbar vollständig in den Bakterien verbleibt.

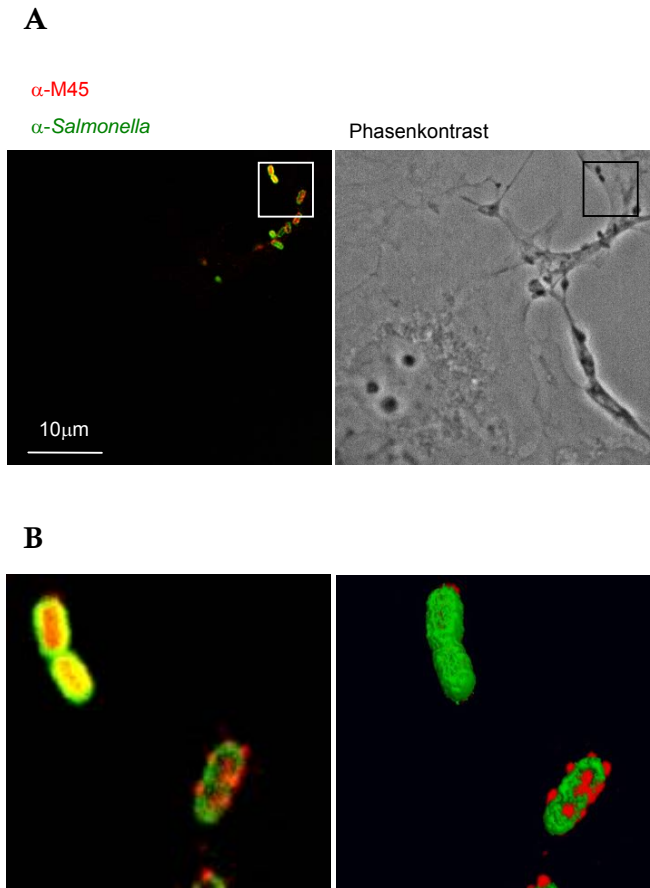


**Abb. 18** SipA<sub>M45</sub>-Nachweis im Zytoplasma von Bakterien bei Inkubation auf gelatinevorbehandelten Mikroskopierdeckgläsern (obere Bilderreihe) und auf COS7-Zellen (untere Bilderreihe). Die Deckgläser bzw. COS7-Zellen wurden für 20min mit 8μl einer SPI-1-induzierten Kultur von M1300 pM972 in 0.5ml HBSS mit 100μg/ml Chloramphenicol inkubiert, fixiert, vollständig permeabilisiert und gegen das M45-Epitop ( $\alpha\text{-M45}/\alpha\text{-Maus-Cy3}$ ) sowie gegen GFP ( $\alpha\text{-GFP}/\alpha\text{-Kaninchen-AMCA}$ ) gefärbt. Die in der Detailsicht betrachteten Bakterien beider Präparate sind, wie aus der  $\alpha\text{-GFP}/\text{AMCA}$ -Färbung ersichtlich, vollständig permeabilisiert. Das  $\alpha\text{-M45}/\text{Cy3}$ -gefärbte SipA<sub>M45</sub> befindet sich bei den auf COS7-Zellen inkubierten Bakterien eindeutig ausserhalb der Bakterien, was bei den ohne COS7-Zellen inkubierten Bakterien nicht der Fall ist. Bilder der oberen und unteren Reihe wurden im gleichen Kanal jeweils unter denselben Belichtungsbedingungen aufgenommen.





**Abb. 19** Semiquantitative Auswertung der Experimente zur zellkontaktabhängigen SipA<sub>M45</sub>-Sekretion bzw. Translokation. Pro experimenteller Bedingung wurden 200 stark *p<sub>sicA</sub>*-GFP-exprimierende Bakterien bezüglich des Gehalts an SipA<sub>M45</sub> im Zytoplasma bewertet. Die Experimente wurden mit (A) und ohne Chloramphenicol (B) durchgeführt. Die Bakterien (M1300 pM972) wurden für die angegebene Zeit in HBSS bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> vorinkubiert. Dann wurden die vorinkubierten Bakterien auf gelatinevorbehandelte Mikroskopierdeckgläser (schwarze Punkte) oder auf Mikroskopierdeckgläser mit COS7-Zellen (rote Punkte) gegeben und für 20min inkubiert. Die Präparate wurden dann fixiert, permeabilisiert (4.9.4) und gefärbt (M45/ $\alpha$ -Maus-Cy3 und  $\alpha$ -GFP/ $\alpha$ -Kaninchen-AMCA). Innerhalb der 20min Inkubation auf COS7-Zellen scheinen über 90% der SipA<sub>M45</sub> exprimierenden Bakterien den grössten Teil des SipA<sub>M45</sub> aus dem bakteriellen Zytoplasma abzugeben. Dies ist nicht der Fall, wenn die Bakterien unter vergleichbaren Bedingungen auf gelatinevorbehandelten Mikroskopierdeckgläsern ohne COS7-Zellen inkubiert wurden. Erst bei genügend langer Vorinkubation nimmt der Anteil der SipA<sub>M45</sub> enthaltenden Bakterien auch ohne die Anwesenheit von COS7-Zellen ab. Dieser Effekt ist stärker in der Anwesenheit von Chloramphenicol. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

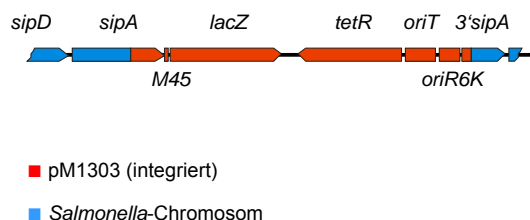


**Abb. 20** Vergleich von intrabakteriellem und sekretiertem SipA<sub>M45</sub> bei der Infektion von COS7-Zellen mit einer SPI-1-induzierten Kultur von M1300, nach 10min fixiert, permeabilisiert (4.9.4) und gefärbt (M45/ $\alpha$ -Maus-Cy3 und  $\alpha$ -*Salmonella* (LPS)/ $\alpha$ -Kaninchen-FITC). **A**: Übersichtsaufnahme der betrachteten COS7-Zelle. **B**: Vergrößerung der in A eingerahmten Stelle. **B links**: Konfokale Aufnahme des Zytoplasmas der Bakterien. Das die Bakterien begrenzende LPS ist grün angefärbt und in diesem zweidimensionalen Schnitt als Ring zu erkennen. Die beiden Bakterien in der oberen linken Bildecke enthalten das rot gefärbte SipA<sub>M45</sub> ganz eindeutig im Inneren, während es im dritten Bakterium unten rechts fast ausschliesslich ausserhalb des LPS lokalisiert ist. **B rechts**: Dreidimensionale Rekonstruktion aus einem Stapel konfokaler Aufnahmen der Bakterien. Bei den Bakterien am oberen Bildrand ist das SipA<sub>M45</sub> vollständig im inneren der Bakterien verborgen, beim dritten Bakterium deutlich ausserhalb der LPS-Schicht.

### 5.2.5 Untersuchung des Einflusses von Wirtszellen auf die *sipA*-Geninduktion

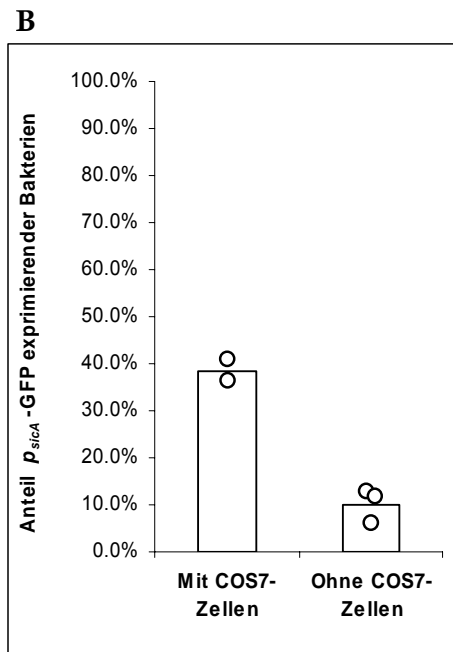
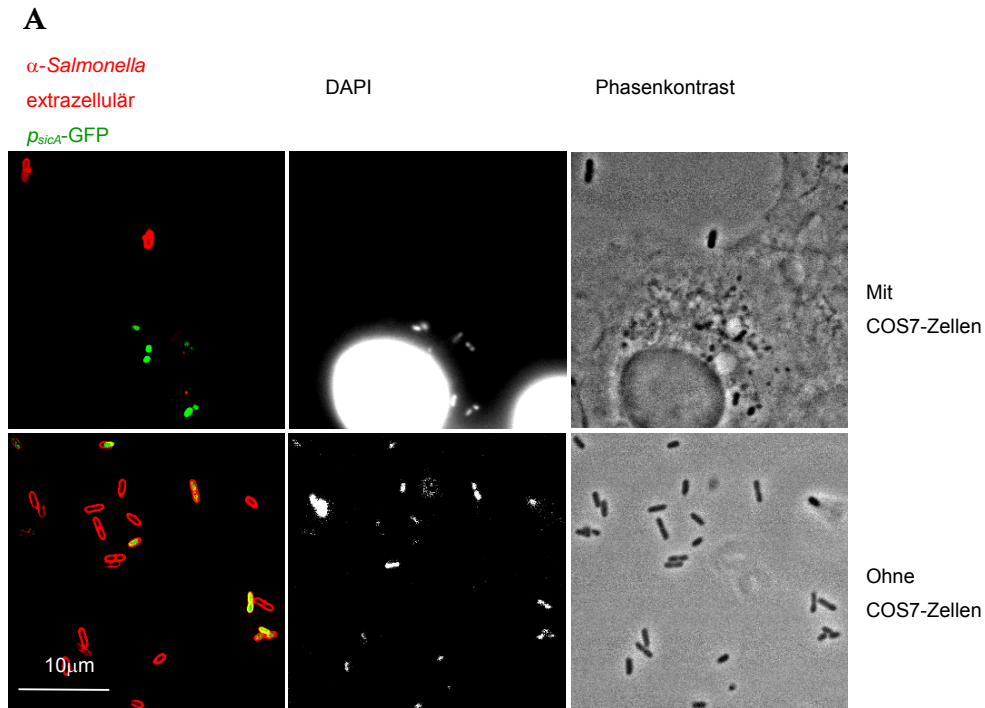
Bei den unter 5.2.4 beschriebenen Experimenten wurde beobachtet, dass der Anteil der stark *p<sub>sicA</sub>*-GFP exprimierenden Bakterien in der Anwesenheit von Zellen höher war als unter vergleichbaren Bedingungen auf gelatinevorbehandelten Mikroskopierdeckgläsern. Diese Beobachtung wurde in einem separaten Experiment verifiziert: COS7-Zellen und gelatinevorbehandelte Mikroskopierdeckgläser wurden parallel unter DME-Medium ohne FCS mit 8 µl einer SPI-1-induzierten Kultur von M1300 pM972 infiziert und nach einer Stunde fixiert (gemäß 4.9.3). Es wurde eine Färbung der extrazellulären Bakterien sowie eine DAPI-Färbung vorgenommen und jeweils 200 Bakterien pro Präparat wurden auf die Expression von *p<sub>sicA</sub>*-GFP hin geprüft. Von den intrazellulären Bakterien in COS7-Zellen zeigten knapp 40% eine deutliche GFP-Fluoreszenz gegenüber knapp 10% auf gelatinevorbehandelten Mikroskopierdeckgläsern (Abb. 22).

Diese Beobachtungen warfen die Frage auf, ob nicht nur die Sekretion von SipA, sondern auch Geninduktion vom Kontakt mit Wirtszellen abhängig sein könnte. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurde mit den Infektionsexperimenten eine  $\beta$ -Galactosidaseaktivitätsmessung kombiniert (4.3.5). Es wurde dabei die *sipA*-Induktion in *Salmonella* Typhimurium M1309 in der Anwesenheit von COS-7-Zellen oder von blossen Zellkulturmedium untersucht. Der Stamm M1309 verfügt chromosomal über eine transkriptionelle *sipA-lacZ*-Fusion (Abb. 21).

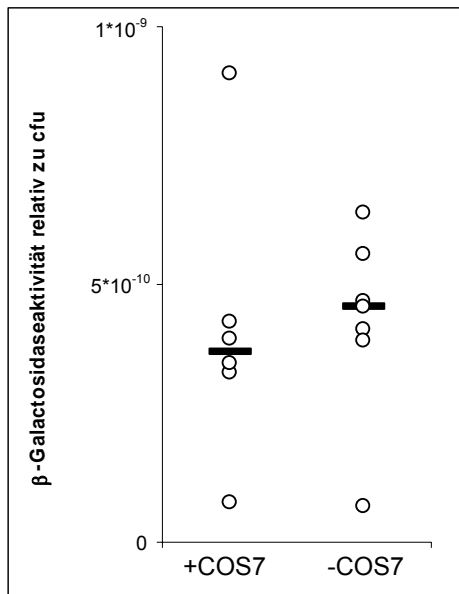


**Abb. 21** Karte des in *sipA* inserierten Reporterkonstrukts zur Bestimmung der Transkriptionsrate von *sipA* über die Messung der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität von *Salmonella* Typhimurium M1309. Der Stamm wurde über homologe Rekombination mit dem Suizidplasmid pM1303 konstruiert (siehe 4.4).

Jeweils 50 µl einer SPI-1-induzierten Kultur von M1309 wurden dabei in Zellkulturschalen mit oder ohne COS7-Zellen in DME-Medium (ohne FCS) gegeben. Nach 1h Infektion wurde allen Schalen Natriumdeoxycholat zugegeben, um die COS7-Zellen (wo vorhanden) zu lysieren. Die Bakterien wurden möglichst vollständig aus den Zellkulturschalen zurückgewonnen, gewaschen, und die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität der Bakterien wurde in Abhängigkeit ihrer cfu-Zahl bestimmt. Es konnten keine Unterschiede in der *sipA-lacZ*-Induktion zwischen Bakterien mit bzw. ohne Wirtszellkontakt festgestellt werden (Abb. 23).



**Abb. 22** Verteilung von  $p_{sicA}$ -GFP exprimierenden Bakterien auf COS7-Zellen bzw. gelatinevorbehandelten Mikroskopierdeckgläsern. Zellen bzw. Deckgläser wurden für 1h unter DME-Medium ohne FCS mit 8  $\mu$ l SPI-1-induzierter Kultur von M1300 pM972 infiziert, fixiert und extrazelluläre Bakterien wurden mit Rhodamin gefärbt. **A:** Qualitativer Vergleich der Präparate. Es scheinen eher die intrazellulären Bakterien zu sein, welche  $p_{sicA}$ -GFP exprimieren. **B:** Auswertung von 200 Bakterien pro Datenpunkt. Das Experiment wurde zwei- bzw. dreimal parallel durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte (Balken) und die einzelnen Werte (Kreise) aus den Experimenten.



**Abb. 23** Untersuchung einer möglichen zellkontaktabhängigen *sipA*-Geninduktion. 50  $\mu$ l einer SPI-1-induzierten Kultur von M1309 wurde in 35mm-Zellkulturschalen mit oder ohne COS7-Zellen gegeben und für 1h inkubiert, das Sediment dieser Suspension wurde danach abzentrifugiert, lysiert und es wurde die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität in Abhängigkeit der cfu-Zahl bestimmt. Es war keine Erhöhung der  $p_{sicA}$ -abhängigen  $\beta$ -Galactosidaseaktivität bei Inkubation in Anwesenheit von COS7-Zellen festzustellen. Gezeigt sind die Daten aus sechs bzw. sieben Aktivitätsmessungen pro experimenteller Bedingung. Die Balken markieren den Medianwert.

## 6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit sollte den zeitlichen Verlauf der *Salmonella*-Infektion von COS7-Zellen näher untersuchen. Es wurden zwei weitgehend unabhängige Projekte durchgeführt. Beim ersten Projekt sollte der zeitliche Verlauf der SPI-1- und SPI-2-Induktion während der Infektion bestimmt werden. Beim zweiten Projekt sollte untersucht werden, ob der Proteintransport über das SPI-1 TTSS durch den Kontakt mit Wirtszellen induziert wird.

### 6.1 Aktivitäten von SPI-1 und SPI-2

In der vorliegenden Arbeit sollte der zeitliche Ablauf einer Infektion von COS7-Zellen mit *Salmonella* Typhimurium analysiert werden. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurde gezeigt, dass das SPI-1 Effektorprotein SipA bis zu vier Stunden nach Infektion in der unmittelbaren Umgebung der invadierten Bakterien nachweisbar ist. Gleichzeitig war ein bis zwei Stunden nach Infektion mittels GFP-Reporterkonstrukt die Induktion des SPI-2-Apparatgens *ssaG* nachweisbar. Das *p<sub>ssaG</sub>*-GFP-Reporterkonstrukt auf dem Plasmid pM973 scheint dabei genau wie das chromosomale *ssaG*-Gen strikt unter der Kontrolle der SPI-2-Regulationsmechanismen zu stehen. In einer *ssrB*-Mutante mit pM973, welcher der zentrale Regulator für SPI-2 fehlt, war nur minimale GFP-Expression nachzuweisen. Überdies wird GFP von Stämmen mit pM973 offenbar ausschliesslich intrazellulär produziert und das Plasmid verhält sich bei Zellkulturinfektionsexperimenten in verschiedenen Sekretionsmutanten der SPI-1- und SPI-2-codierten TTSS gleich. Diese Eigenschaften machen das Plasmid pM973 zu einem nützlichen Werkzeug zur Markierung von intrazellulären Bakterien. Es wird zurzeit in mehreren anderen Projekten in der Arbeitsgruppe von Prof. W.-D. Hardt (Institut für Mikrobiologie, ETH Zürich) eingesetzt, beispielsweise bei Infektionsexperimenten mit Mäusen.

Der Vergleich von SipA<sub>M45</sub>-Sekretion und der Expression von *p<sub>ssaG</sub>*-GFP liessen die Vermutung zu, dass während einer gewissen Phase (1-4h nach Infektionsbeginn) der *Salmonella*-Infektion sowohl das auf SPI-1 wie auch das auf SPI-2 codierte TTSS aktiv ist. Trotz der frühen SPI-2 Geninduktion liessen sich aber auf SPI-2 codierte Effektorproteine in keinem der untersuchten

Fälle früher als acht Stunden nach Infektionsbeginn nachweisen. Dass die Proteine zu früheren Zeitpunkten nur produziert und nicht sekretiert werden, ist dabei sehr unwahrscheinlich, zumal das bakterielle Zytoplasma für Immunfluoreszenzfärbung leichter zugänglich wird, sobald sich die Bakterien in der Wirtszelle befinden (Salcedo and Holden 2003). In diesen Fällen würden die unter 4.9.3 beschriebenen milden Bedingungen für eine Permeabilisierung der Bakterien ausreichen.

Die wahrscheinlichste Ursache für den zeitlichen Unterschied ist wohl eine zu niedrige Sensitivität der Immunfluoreszenzfärbung: Zum Nachweis von Effektorproteinen mit dieser Methode ist eine bestimmte Menge an Protein nötig, welche in den vorliegenden Versuchen möglicherweise erst nach acht Stunden erreicht war, während das GFP unter der Kontrolle derselben Promotoren schon zu früheren Zeitpunkten detektierbar war. Eine weitere mögliche Ursache für die zeitliche Verzögerung zwischen *ssaG*-Induktion und Effektorproteinsekretion könnte die Assemblierung des SPI-2-codierten Typ III Sekretionssystems vorgängig zur Produktion und Sekretion von Effektorproteinen sein. Hier sind in Zukunft weitere Untersuchungen nötig. Ausserdem ist aufgrund des langen Verbleibs von SipA die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dass dieses SPI-1-codierte Effektorprotein auch über den vielleicht schon vorhandenen SPI-2 Sekretionsapparat transloziert werden kann.

Die Funktion der beiden Pathogenitätsinseln SPI-1 und SPI-2 wurde bis jetzt vorwiegend getrennt betrachtet. Die vorliegende Arbeit gibt aber Hinweise darauf, dass zumindest das SPI-1 Effektorprotein SipA häufig bis nach der Induktion von SPI-2-Genen in infizierten Zellen vorliegt. Die ermittelten Daten lassen so Spekulationen über eine Beteiligung von SipA an Prozessen, die während der intrazellulären Phase der *Salmonella*-Infektion stattfinden und über eine Beteiligung an Invasionsprozessen hinausgehen, zu. Eine solche Funktion wurde schon für SipB gezeigt, das in Makrophagen Apoptose auslöst (Hersh, Monack et al. 1999). Andere Arbeiten geben Hinweise darauf, dass die SPI-1-vermittelte Induktion der Einwanderung von polymorphonukleären Granulozyten unabhängig von der Invasion von *Salmonella* Typhimurium ist (Gewirtz, Siber et al. 1999). Ein ungefährer zeitlicher Ablauf dieser Phänomene während der frühen Phase der Infektion oder eine mögliche zeitliche und räumliche Kolo-kalisation mit SPI-2 assoziierten Prozessen wurden dabei aber nicht untersucht.

Die Struktur und Funktion von SipA waren Bestandteil detaillierter Untersuchungen, die die Beteiligung dieses Proteins an Zytoskelettlagerungen durch Bindung und Stabilisierung von Actinfilamenten zeigen (Galkin, Orlova et al. 2002; Lilic, Galkin et al. 2003). Aufgrund der zentralen Bedeutung von SPI-1 für die Invasion war es nahe liegend, die Funktionsweise von SipA in erster Linie unter dem Aspekt der Invasion zu betrachten. Interessanterweise scheint dieses Effektorprotein auch bei der Induktion einer Inflam-mationsantwort in Mäusen eine wichtige Rolle zu spielen (Hapfelmeier, Ehrbar et al. 2004). Zusätzlich scheint die Restrukturierung des Actin-Zytoskeletts auch eine der Funktionen von SPI-2 Effektorproteinen zu sein (Meresse, Unsworth et al. 2001; Yu, Ruiz-Albert et al. 2002). Obwohl diese Actinumlagerungen zeitlich klar getrennt vom entsprechenden SPI-1-abhängigen Prozess

vonstatten gehen, bleibt die Frage, ob und was für eine Rolle SipA in der intrazellulären Phase der Infektion haben kann. In dieser Phase bleibt es nämlich für zwei bis vier Stunden nach Infektion nachweisbar. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Hinweise darauf, dass SipA (und vermutlich auch weitere SPI-1 Effektorproteine) neben der Invasion noch andere Funktionen haben könnten. Ob SipA oder SPI-2 vermittelte Actinumlagerung direkt oder indirekt mit inflammatorischen Prozessen in Zusammenhang stehen, bleibt aber unklar.

## 6.2 Wirtszellkontakt und SPI-1-abhängige Prozesse

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde auf eine möglichen Induktion der Effektorproteintranslokation über das auf SPI-1 codierte Typ III Sekretionssystem durch die Anwesenheit von Epithelzellen eingegangen. Diesbezügliche Untersuchungen gestalteten sich bei *Salmonella* Typhimurium in der Vergangenheit als sehr schwierig. Während zellkontaktabhängige Proteinsekretion über Typ III Sekretionssysteme für *Shigella flexneri* und *Yersinia* spp. schon gezeigt wurde (Menard, Sansonetti et al. 1994; Persson, Nordfelth et al. 1995; Watarai, Tobe et al. 1995), ist eine solche Induktion für *Salmonella* Typhimurium bislang nicht eindeutig nachgewiesen worden. Bisherige dies betreffende Experimente in *Salmonella* Typhimurium basierten auf der Western Blot Analyse von Kulturüberständen und Kultursedimenten (Zierler and Galan 1995; Daefler 1999).

Eine Analyse von Zellkulturüberstand und Sediment bei Zellkulturinfektionsexperimenten gibt allerdings nur einen Teil der ablaufenden Prozesse wieder, denn die Sekretion ins umgebende Medium kann nicht mit der Translokation von Effektorproteinen in die Wirtszelle gleichgesetzt werden: Die zitierten Arbeiten zu *Shigella flexneri* schlagen ein Modell vor, nach welchem die vorproduzierten Effektorproteine nach Wirtszellkontakt stochastisch in die Wirtszelle und ins umgebende Medium sekretiert werden (Menard, Sansonetti et al. 1994; Watarai, Tobe et al. 1995). Ganz anders präsentiert sich die Situation in *Yersinia* spp., wo offenbar die Gene der Effektoren bis zum Wirtszellkontakt reprimiert bleiben und erst nach Zellkontakt exprimiert und ins Wirtszellzytoplasma transloziert werden, nicht aber ins umgebende Medium (Persson, Nordfelth et al. 1995; Pettersson, Nordfelth et al. 1996). In *Salmonella* spp. ist die Situation wiederum weniger klar: Von SipC beispielsweise, das in einer der Arbeiten zur zellkontaktabhängigen Sekretion untersucht wurde (Daefler 1999), wird vermutet, dass es als Teil des Sekretionsprozesses in die Wirtszellmembran eingelagert wird (Osiecki, Barker et al. 2001). In quantitativen Western Blot Analysen wird aber der aus den Bakterien entlassene Anteil von SipC



zu über 50% im umgebenden Medium gefunden und zu ungefähr gleichen Teilen in löslicher und unlöslicher Wirtszellfraktion (Collazo and Galan 1997).

Die biochemischen Untersuchungen einer möglichen Induktion der Sekretion über das auf SPI-1 TTSS zeichnen also ein eher widersprüchliches Bild. Eine weitere Schwierigkeit bei der Untersuchung der Sekretionsinduktion lag möglicherweise bei der in der vorliegenden Arbeit gefundenen Heterogenität der SPI-1-induzierten Kulturen: Veränderungen zu untersuchen, die nur bei etwa 10% der Gesamtpopulation, die überhaupt SipA<sub>M45</sub> exprimierten, stattfinden konnten. Mit Hilfe des *p<sub>sicA</sub>*-GFP-Reporterkonstrukts gelang es in der vorliegenden Arbeit, die Analyse der wirtszellinduzierten Effektorproteintranslokation auf diejenigen Bakterien zu beschränken, die das Protein auch wirklich exprimierten. Ausserdem erlaubte das hier entwickelte Permeabilisierungsprotokoll die Analyse individueller Bakterien.

Es scheint auch, dass in früheren Arbeiten nie ganz klar war, wo die Effektorproteine nach einer möglichen Induktion des TTSS nachzuweisen seien. Offensichtlich kommen dafür aber mindestens drei Möglichkeiten in Frage: Der Kulturüberstand (bei Sekretion der Effektorproteine ins umgebende Medium), das Zytoplasma der Wirtszellen (bei Translokation) sowie die unlösliche Membranfraktion der Wirtszellen (bei Insertion der Effektorproteine in die Wirtszellmembran). Je nach untersuchter Fraktion sind bei Western Blot Analysen unterschiedliche Resultate zu erwarten, und keine der Arbeiten zur Sekretionsinduktion bei *Salmonella* Typhimurium scheint diesem Umstand genügend Rechnung getragen zu haben (Zierler and Galan 1995; Daefer 1999).

Das Problem dieser unklaren Lokalisierung des Effektorproteins wurde in der vorliegenden Arbeit umgangen, indem als zu bestimmende Grösse der Verlust des Effektorproteins aus dem bakteriellen Zytoplasma betrachtet wurde, welcher auf COS7-Zellen innerhalb von 20min nahezu vollständig war, während der Anteil an SipA<sub>M45</sub>-enthaltenden Bakterien auf gelatinevorbehandelten Mikroskopierdeckgläsern erst nach fast einer Stunde abzunehmen begann. Die wirtszellinduzierte Translokation von SipA<sub>M45</sub> konnte so eindeutig von einer wirtszellunabhängigen Sekretion ins Medium abgegrenzt werden. Dabei ist es ausserdem wahrscheinlich, dass ein Teil des Verlusts von SipA<sub>M45</sub> nach längeren Inkubationszeiten in HBSS, insbesondere mit Chloramphenicol, auf Veränderungen des Stoffwechsels im nährstoffarmen Medium zurückzuführen ist.

Die vor allem auf COS7-Zellen beobachtete Abwesenheit von SipA<sub>M45</sub> in stark SPI-1-induzierten Bakterien ist nicht auf ungenügende Permeabilisierung der bakteriellen Zellwand zurückzuführen, wie mit einer parallelen  $\alpha$ -GFP-Immunfärbung gezeigt wurde. Bei den meisten betrachteten Bakterien auf COS7-Zellen lag ausserdem das translozierte SipA<sub>M45</sub> um den Bakterienkörper in einer Menge vor, welche qualitativ der beobachteten Menge in nicht sekretierenden Bakterien entsprach. Diese Beobachtung deutet auf einen Translokationsmechanismus hin, bei dem das in den Bakterien akkumulierte SipA bei Wirtszellkontakt aus SPI-1-induzierten Bakterien direkt und effizient ins Wirtszellzytoplasma entlassen wird (Abb. 18). Dabei spricht die Tatsache, dass sekretiertes SipA vor allem in der Umgebung von internalisierten Bakterien beobachtet wurde, für

eine schnelle Invasion der Bakterien nach oder sogar schon während der Translokation von SipA<sub>M45</sub> (Abb. 11).

Eine mögliche mangelnde Sensitivität der  $\alpha$ -M45-Färbung scheint nicht der Grund für die beobachtete Abwesenheit von SipA<sub>M45</sub> in 90% der Bakterien zu sein. Um dies auszuschliessen wurde eine SPI-1-induzierte Kultur von Bakterien, welche für SipA<sub>M45</sub> auf einem Plasmid mit hoher Kopienzahl codierten (SB300 pM1301) untersucht. Das SipA<sub>M45</sub> stand dabei unter der Kontrolle des *sopE*-Promotors, der von SPI-1 kontrolliert wird (Darwin and Miller 2001). Auch in diesem Experiment wurde SipA<sub>M45</sub> nur bei einem Bruchteil der Bakterien beobachtet. Allerdings war hier bei denjenigen Bakterien, die es tatsächlich exprimierten, die Menge von SipA<sub>M45</sub> erhöht. Dies scheint die Beobachtungen einer bezüglich der SPI-1-Induktion heterogenen Population zu bestätigen. Dass *sipA<sub>M45</sub>* auf dem verwendeten Plasmid pM1301 unter der Kontrolle des *sopE*-Promotors steht, wirft die Frage auf, ob noch andere SPI-1-abhängige Effektorproteine heterogene Expressionsmuster in der Bakterienpopulation aufweisen. Zumal offenbar auch *sopE* nicht in allen Bakterien einer solchen Kultur gleichermassen exprimiert wird, wäre ein interessantes Experiment die Untersuchung der Kolo-kalisation der *p<sub>sicA</sub>*-GFP-Expression und der Produktion anderer über das SPI-1-abhängige TTSS translozierter Effektorproteine. Speziell interessant sind dabei Effektorproteine, welche nicht wie SipA auch unter der Kontrolle des *sicA*-Promotors stehen oder sogar ausserhalb von SPI-1 codiert sind. Eine strenge Korrelation von *p<sub>sicA</sub>*-GFP- und der Expression der Effektorproteine würde für eine Situation sprechen, in der in einer „SPI-1-induzierten“ Kultur nur eine Minderheit der Bakterien eine erhöhte SPI-1- und Effektorproteinexpression aufweist. Umgekehrt wäre aber auch denkbar, dass die übrigen Effektorproteine unabhängig von SipA exprimiert werden. In diesem Fall hätte jedes Bakterium einen „speziellen“ Cocktail von Effektorproteinen. Das könnte vielleicht für eine Art Arbeitsteilung unter den invadierenden Bakterien sprechen. Die Wiederholung der unter 5.2.3 und 5.2.4 beschriebenen Versuche mit anderen über SPI-1 translozierten Effektorproteinen wird deshalb Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Aufgrund des erhöhten Anteils an stark *p<sub>sicA</sub>*-GFP exprimierenden Bakterien auf COS7-Zellen wurde eine mögliche zusätzliche SPI-1-Geninduktion durch die Anwesenheit von COS-7-Zellen mittels chromosomaler transkriptioneller *sipA-lacZ*-Fusion untersucht. Es konnte aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig gezeigt werden, ob der erhöhte Anteil von *p<sub>sicA</sub>*-GFP-exprimierenden Bakterien auf COS7-Zellen auf eine durch die COS7-Zellen hervorgerufene Geninduktion zurückzuführen ist. Genauso plausibel liesse sich nämlich argumentieren, dass die stärker *p<sub>sicA</sub>*-GFP-exprimierenden Bakterien invasiver seien und deshalb mit grösserer Wahrscheinlichkeit mit COS7-Zellen assoziiert vorlägen. Bei der Fixierung und Färbung würden dann bevorzugt die nicht *p<sub>sicA</sub>*-GFP exprimierenden extrazellulären Bakterien abgewaschen, auf gelatinevorbehandelten Mikroskopierdeckgläsern würde hingegen eher eine repräsentative Bakterienpopulation zu beobachten sei. Auch diese Interpretationsmöglichkeit wäre einleuchtend und kompatibel mit der Hypothese einer heterogenen SPI-1-induzierten Bakterienkultur. Leider erwies sich bei der  $\beta$ -Galactosidaseaktivitätsmessung die cfu-Zahl als schwer zu kontrollierende

Grösse, welche im Nenner der entsprechenden Gleichung (siehe 4.3.5) auch bei kleinen Veränderungen zu grossen Unterschieden in den resultierenden normierten Aktivitäten führten. Aus diesem Grund erwies sich der Vergleich der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität zwischen intrazellulären mit extrazellulären Bakterien durch Trennung der infizierten Zellen vom Überstand als relativ ungenau. An dieser Stelle liessen sich wohl weitere Erkenntnisse aus Fluoreszenzzytometrie-Analysen ziehen, wo in einer grossen Zahl von Bakterien beispielsweise die Expression von  $p_{sicA}$ -GFP bei Intrazellulären und Extrazellulären verglichen werden könnten.

Eine interessante Beobachtung, welche zu weiteren Untersuchungen Anlass geben könnte, ist die Anordnung des sekretierten SipA<sub>M45</sub> um die Bakterien, wie sie in allen Abbildungen, wo die Sekretion von SipA<sub>M45</sub> gezeigt ist, zu beobachten ist. SipA<sub>M45</sub> scheint inhomogen um die Bakterien verteilt, in fünf bis zehn Punkten konzentriert vorzukommen. Ob diese Lokalisierung die Anordnung der Translokationsapparate widerspiegelt, lässt sich an dieser Stelle nur vermuten. Es wird allerdings angenommen, dass die Anzahl der SPI-1 TTSS auf einem Bakterium um einiges grösser ist, nämlich bis zu 100 Sekretionsapparaten pro Bakterium (Kubori, Matsushima et al. 1998). Weitere Immunfluoreszenzexperimente oder Experimente mit Transmissions-Elektronenmikroskopie wären nötig, um diesen Unterschied zu verifizieren und Gründe dafür zu untersuchen: Möglicherweise sind nicht alle Typ III Sekretionssysteme in einem Bakterium gleich aktiv, oder die Sekretionsapparate entfalten ihre Wirkung gebündelt nur an bestimmten Stellen des Bakteriums.

Der beeindruckende, nadelartige Aufbau des auf SPI-1 codierten Typ III Sekretionssystems suggeriert die Existenz eines Mechanismus einer „molekularen Spritze“, die Effektorproteine bei Kontakt durch die Zytoplasmamembran in eine Wirtszelle injiziert. Die Hypothese der kontaktabhängigen Typ III Sekretion konnte aber für *Salmonella* Typhimurium bislang keineswegs eindeutig gezeigt werden.

Für die Geninduktion der auf SPI-1 codierten TTSS-Komponenten wurden in mehreren Arbeiten die Abhängigkeit von Umweltfaktoren wie Calciumkonzentration, Osmolarität, pH oder Sauerstoffpartialdruck gezeigt (zusammengefasst in (Lucas and Lee 2000)), jedoch nicht vom Kontakt mit eukaryotischen Zellen wie in *Yersinia* spp. (Pettersson, Nordfelth et al. 1996). Was die Kontrolle der Sekretion betrifft, wurde dagegen eine kontaktabhängige Sekretion beinahe vorausgesetzt (Galan 1996), obwohl die Datenlage bei *Salmonella* Typhimurium einiges unsicherer war als bei *Shigella* und *Yersinia* spp. (Persson, Nordfelth et al. 1995; Watarai, Tobe et al. 1995). Bislang wurde lediglich eine gewisse Abhängigkeit der Sekretion von Umweltfaktoren gezeigt (Daefler 1999).

Die vorliegende Arbeit gibt nun klare Hinweise darauf, dass es sich beim Transport von SipA über das SPI-1 Typ III Sekretionssystem um eine Mischform der Prozesse handeln könnte, wie sie bei *Shigella flexneri* und *Yersinia* spp. beobachtet wurden: Das Effektorgen wird induziert durch noch nicht völlig aufgeklärte Umweltfaktoren. Das Effektorprotein liegt dann offenbar vorproduziert im Bakterium vor (wie in *Shigella flexneri*) und wird nur langsam „spontan“ ins umgebene Medium

abgegeben ( $t_{1/2} > 1h$ ). Der Kontakt mit einer Epithelzelle induziert dann die schnelle Translokation ( $t_{1/2} < 20min$ ) ins Zytoplasma der Wirtszelle (wie in *Yersinia* spp.). Die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf andere SPI-1-Effektorproteine sowie den molekularen Auslösemechanismus dieses offenbar schnellen und effizienten Translokationsprozesses gilt es nun genauer zu untersuchen.

## 7 Verwendete Abkürzungen

A	Absorption
BisTris	2,2-Bis-(hydroxyethyl)-(iminotris)-(hydroxymethyl)-methan
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cfu	“Colony forming units“, entspricht der Anzahl proliferationsfähiger Bakterien
Da	Dalton, molare Masse in Gramm
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol-(HCl) <sub>2</sub>
DMEM	“Dulbecco's modified Eagle Medium“, Standard-Zellkulturmedium
DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl: ...acid)
dNTP	Desoxyribonucleotid-triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure (engl: ...acetic acid)
EBU-Agar	Evans Blue-Uranin-Agar
FCS	“Fetal calf serum“, Zusatz für DMEM
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
HBSS	“Hank's balanced salt solution“, Isotonische Salzlösung für Zellkulturen
kb	Kilobasen(paare)
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium (ursprüngl. „Lysogeny Broth“)
LPS	Lipopolysaccharid
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600nm, entspricht der Absorption
PBS	„Phosphate buffered saline“, Isotonische Salzlösung
p <sub>x</sub> -Y	Protein Y unter der Kontrolle des Promotors von Gen x
RFP	Rotfluoreszierendes Protein
(r)RNA	(ribosomale) Ribonucleinsäure (engl: ...acid)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl: Sodium...)
SPI-1	<i>Salmonella</i> Pathogenitätsinsel 1
SPI-2	<i>Salmonella</i> Pathogenitätsinsel 2
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure (engl: ...acetic acid)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin-1,2-bis[Dimethylamino]ethan
Tris	N,N,N-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTSS	„Type III (three) secretion system“

## 8 Literaturverzeichnis

- Barthel, M., S. Hapfelmeier, et al. (2003). "Pretreatment of Mice with Streptomycin Provides a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Colitis Model That Allows Analysis of Both Pathogen and Host." Infect. Immun. **71**(5): 2839-2858.
- Baumler, A. J. (1997). "The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*." Trends in Microbiology **5**(8): 318-322.
- Boyd, E., F. Wang, et al. (1996). "Molecular genetic relationships of the *salmonellae*." Appl. Environ. Microbiol. **62**(3): 804-808.
- Buchwald, G., A. Friebe, et al. (2002). "Structural basis for the reversible activation of a Rho protein by the bacterial toxin SopE." EMBO J. **21**(13): 3286-95.
- Cirillo, D. M., R. H. Valdivia, et al. (1998). "Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival." Mol Microbiol **30**(1): 175-188.
- Collazo, C. M. and J. E. Galan (1997). "The invasion-associated type III system of *Salmonella* typhimurium directs the translocation of Sip proteins into the host cell." Mol Microbiol **24**(4): 747-756.
- Cornelis, G. R. and F. Van Gijsegem (2000). "Assembly and function of type III secretory systems." Annual Review of Microbiology **54**(1): 735-774.
- Crosa, J. H., D. J. Brenner, et al. (1973). "Molecular Relationships Among the Salmonellae." J Bacteriol **115**(1): 307-315.
- Daefler, S. (1999). "Type III secretion by *Salmonella* typhimurium does not require contact with a eukaryotic host." Mol Microbiol **31**(1): 45-51.
- Darwin, K. H. and V. L. Miller (2001). "Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella* typhimurium." EMBO J. **20**(8): 1850-1862.
- Deiwick, J., T. Nikolaus, et al. (1999). "Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression." Mol Microbiol **31**(6): 1759-1773.
- Edwards, R. A., G. J. Olsen, et al. (2002). "Comparative genomics of closely related *salmonellae*." Trends in Microbiology **10**(2): 94-99.
- Ehrbar, K., A. Friebe, et al. (2003). "Role of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) Protein InvB in Type III Secretion of SopE and SopE2, Two *Salmonella* Effector Proteins Encoded Outside of SPI-1." J. Bacteriol. **185**(23): 6950-6967.

- Ehrbar, K., S. Miold, et al. (2002). "Characterization of effector proteins translocated via the SPI1 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*." Int J Med Microbiol **291**(6-7): 479-485.
- Freeman, J. A., M. E. Ohl, et al. (2003). "The *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Translocated Effectors SseJ and SifB Are Targeted to the *Salmonella*-Containing Vacuole." Infect. Immun. **71**(1): 418-427.
- Fu, Y. and J. Galan (1999). "A *salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion." Nature **401**(6750): 293-7.
- Galan, J. (1996). "Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells." Mol Microbiol **20**(2): 263-71.
- Galan, J. E. and A. Collmer (1999). "Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for Protein Delivery into Host Cells." Science **284**(5418): 1322-1328.
- Galan, J. E. and R. Curtiss, III. (1989). "Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(16): 6383-7.
- Galkin, V. E., A. Orlova, et al. (2002). "The bacterial protein SipA polymerizes G-actin and mimics muscle nebulin." Nat Struct Biol. **9**(7): 518-21.
- Gewirtz, A. T., A. M. Siber, et al. (1999). "Orchestration of Neutrophil Movement by Intestinal Epithelial Cells in Response to *Salmonella typhimurium* Can Be Uncoupled from Bacterial Internalization." Infect. Immun. **67**(2): 608-617.
- Gluzman, Y. (1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." Cell **23**(1): 175-82.
- Goldschmidt, R., M. Thoren-Gordon, et al. (1990). "Regions of the *Streptococcus sobrinus* spaA gene encoding major determinants of antigen I." J Bacteriol **172**(7): 3988-4001.
- Guy, R. L., L. A. Gonias, et al. (2000). "Aggregation of host endosomes by *Salmonella* requires SPI2 translocation of SseFG and involves SpvR and the fms-aroE intragenic region." Mol Microbiol **37**(6): 1417-1435.
- Hansen-Wester, I. and M. Hensel (2001). "*Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems." Microbes and Infection **3**(7): 549-559.
- Hansen-Wester, I., B. Stecher, et al. (2002). "Type III Secretion of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Translocated Effectors and SseFG." Infect. Immun. **70**(3): 1403-1409.
- Hapfelmeier, S., K. Ehrbar, et al. (2004). "Role of *Salmonella* pathogenicity island 1 effector proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in *Salmonella enterica* Subspecies 1 Serovar Typhimurium colitis in streptomycin-treated mice." Infect Immun **72**(2): 795-809.
- Hardt, W.-D., L.-M. Chen, et al. (1998). "S. typhimurium Encodes an Activator of Rho GTPases that Induces Membrane Ruffling and Nuclear Responses in Host Cells." Cell **93**: 815-826.
- Hayward, R. D. and V. Koronakis (1999). "Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*." EMBO J. **18**(18): 4926-4934.
- Hensel, M. (2000). "*Salmonella* Pathogenicity Island 2." Mol Microbiol **36**(5): 1015-1023.
- Hensel, M., J. E. Shea, et al. (1998). "Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages." Mol Microbiol **30**(1): 163-174.

- Herrero, M., V. de Lorenzo, et al. (1990). "Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria." J Bacteriol **172**(11): 6557–6567.
- Hersh, D., D. M. Monack, et al. (1999). "The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1." PNAS **96**(5): 2396-2401.
- Hoiseth, S. K. and B. A. Stocker (1981). "Aromatic-dependent *Salmonella* typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines." Nature **291**(5812): 238-9.
- Hueck, C. J. (1998). "Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**(2): 379-433.
- Jantsch, J., C. Cheminay, et al. (2003). "Intracellular activities of *Salmonella enterica* in murine dendritic cells." Cell Microbiol **5**(12): 933-945.
- Kaniga, K., J. C. Bossio, et al. (1994). "The *Salmonella* typhimurium invasion genes invF and invG encode homologues of the AraC and PulD family of proteins." Mol Microbiol **13**(4): 555-68.
- Kaniga, K., J. Uralil, et al. (1996). "A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella* typhimurium." Mol Microbiol **21**(3): 633-41.
- Kimbrough, T. G. and S. I. Miller (2002). "Assembly of the type III secretion needle complex of *Salmonella* typhimurium." Microbes and Infection **4**(1): 75-82.
- Knodler, L. A. and O. Steele-Mortimer (2003). "Taking Possession: Biogenesis of the *Salmonella*-Containing Vacuole." Traffic **4**(9): 587-599.
- Kubori, T., Y. Matsushima, et al. (1998). "Supramolecular Structure of the *Salmonella* typhimurium Type III Protein Secretion System." Science **280**(5363): 602-605.
- Kubori, T., A. Sukhan, et al. (2000). "Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella* typhimurium type III protein secretion system." PNAS **97**(18): 10225-10230.
- Kuhle, V. and M. Hensel (2002). "SseF and SseG are translocated effectors of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 that modulate aggregation of endosomal compartments." Cell Microbiol **4**(12): 813-824.
- Le Minor, L. and M. Y. Popoff (1987). "Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*." Int J Syst Bacteriol **37**: 465–468.
- Lee, C. A., M. Silva, et al. (2000). "A secreted *Salmonella* protein induces a proinflammatory response in epithelial cells, which promotes neutrophil migration." PNAS **97**(22): 12283-12288.
- Lilic, M., V. E. Galkin, et al. (2003). "*Salmonella* SipA Polymerizes Actin by Stapling Filaments with Nonglobular Protein Arms." Science **301**(5641): 1918-1921.
- Lucas, R. L. and C. A. Lee (2000). "Unravelling the mysteries of virulence gene regulation in *Salmonella* typhimurium. MicroReview." Mol Microbiol **36**(5): 1024-1033.
- MacBeth, K. and C. A. Lee (1993). "Prolonged inhibition of bacterial protein synthesis abolishes *Salmonella* invasion." Infect Immun **61**(4): 1544–1546.
- McGhie, E., R. Hayward, et al. (2004). "Control of Actin Turnover by a *Salmonella* Invasion Protein." Molecular Cell **13**: 497-510.



- Mead, P. S., L. Slutsker, et al. (1999). "Food-related illness and death in the United States." Emerg Infect Dis **5**(6): 607-25.
- Menard, R., P. Sansonetti, et al. (1994). "The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD." EMBO J. **13**(22): 5293-302.
- Meresse, S., K. E. Unsworth, et al. (2001). "Remodelling of the actin cytoskeleton is essential for replication of intravacuolar *Salmonella*." Cell Microbiol **3**(8): 567-577.
- Miao, E. A., C. A. Scherer, et al. (1999). "*Salmonella* typhimurium leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems." Mol Microbiol **34**(4): 850-864.
- Miller, V. and J. Mekalanos (1988). "A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR." J Bacteriol **170**(6): 2575-2583.
- Minamino, T. and R. M. Macnab (1999). "Components of the *Salmonella* Flagellar Export Apparatus and Classification of Export Substrates." J. Bacteriol. **181**(5): 1388-1394.
- Norris, F. A., M. P. Wilson, et al. (1998). "SopB, a protein required for virulence of *Salmonella* dublin, is an inositol phosphate phosphatase." PNAS **95**(24): 14057-14059.
- Obert, S., R. J. O'Connor, et al. (1994). "The adenovirus E4-6/7 protein transactivates the E2 promoter by inducing dimerization of a heteromeric E2F complex." Mol Cell Biol **14**(2): 1333-46.
- Osiecki, J. C., J. Barker, et al. (2001). "IpaC from *Shigella* and SipC from *Salmonella* possess similar biochemical properties but are functionally distinct." Mol Microbiol **42**(2): 469-481.
- Pang, T., Z. A. Bhutta, et al. (1995). "Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge." Trends in Microbiology **3**(7): 253-255.
- Persson, C., R. Nordfelth, et al. (1995). "Cell-surface-bound *Yersinia* translocate the protein tyrosine phosphatase YopH by a polarized mechanism into the target cell." Mol Microbiol **18**(1): 135-50.
- Pettersson, J., R. Nordfelth, et al. (1996). "Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact." Science **273**(5279): 1231-3.
- Philipps, B., J. Hennecke, et al. (2003). "FRET-based in Vivo Screening for Protein Folding and Increased Protein Stability." Journal of Molecular Biology **327**(1): 239-249.
- Phoebe Lostroh, C. and C. A. Lee (2001). "The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system." Microbes and Infection **3**(14-15): 1281-1291.
- Post, L., A. Arfsten, et al. (1980). "DNA sequence of the promoter region for the alpha ribosomal protein operon in *Escherichia coli*." J. Biol. Chem. **255**(10): 4653-4659.
- Reeves, M. W., G. M. Evins, et al. (1989). "Clonal nature of *Salmonella* typhi and its genetic relatedness to other *salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov." J Clin Microbiol **27**(2): 313-320.
- Ruiz-Albert, J., X.-J. Yu, et al. (2002). "Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the *Salmonella* typhimurium vacuolar membrane." Mol Microbiol **44**(3): 645-661.
- Salcedo, S. P. and D. W. Holden (2003). "SseG, a virulence protein that targets *Salmonella* to the Golgi network." EMBO J. **22**(19): 5003-5014.

- Steele-Mortimer, O., J. H. Brumell, et al. (2002). "The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells." Cell Microbiol **4**(1): 43-54.
- Stein, M., K. Leung, et al. (1996). "Identification of a *Salmonella* virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells." Mol Microbiol **20**(1): 151-64.
- Stender, S., A. Friebel, et al. (2000). "Identification of SopE2 from *Salmonella* typhimurium, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell." Mol Microbiol **36**(6): 1206-1221.
- Tucker, S. C. and J. E. Galan (2000). "Complex Function for SicA, a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Type III Secretion-Associated Chaperone." J. Bacteriol. **182**(8): 2262-2268.
- Uchiya, K.-i., M. A. Barbieri, et al. (1999). "A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking." EMBO J. **18**(14): 3924-3933.
- Valdivia, R. H. and S. Falkow (1997). "Fluorescence-Based Isolation of Bacterial Genes Expressed Within Host Cells." Science **277**(5334): 2007-2011.
- Wallis, T. S. and E. E. Galyov (2000). "Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. MicroReview." Mol Microbiol **36**(5): 997-1005.
- Watarai, M., H. L. Andrews, et al. (2001). "Formation of a fibrous structure on the surface of *Legionella pneumophila* associated with exposure of DotH and DotO proteins after intracellular growth." Mol Microbiol **39**(2): 313-330.
- Watarai, M., T. Tobe, et al. (1995). "Contact of *Shigella* with host cells triggers release of Ipa invasins and is an essential function of invasiveness." EMBO J. **14**(11): 2461-70.
- Waterman, S. R. and D. W. Holden (2003). "Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system." Cell Microbiol **5**(8): 501-511.
- Wood, M., R. Rosqvist, et al. (1996). "SopE, a secreted protein of *Salmonella* dublin, is translocated into the target eukaryotic cell via a sip-dependent mechanism and promotes bacterial entry." Mol Microbiol **22**(2): 327-38.
- Yu, X.-J., J. Ruiz-Albert, et al. (2002). "SpiC is required for secretion of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 type III secretion system proteins." Cell Microbiol **4**(8): 531-540.
- Zhou, D., M. S. Mooseker, et al. (1999). "Role of the *S. typhimurium* Actin-Binding Protein SipA in Bacterial Internalization." Science **283**(5410): 2092-2095.
- Zierler, M. and J. Galan (1995). "Contact with cultured epithelial cells stimulates secretion of *Salmonella* typhimurium invasion protein InvJ." Infect. Immun. **63**(10): 4024-4028.

## 9 Dank

Ich möchte Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt für die Gelegenheit danken, in seiner Arbeitsgruppe ein so interessantes und vielseitiges Thema bearbeiten zu dürfen, für die Unterstützung bei allen wichtigen Fragen und für unerschöpflich viele neue Anregungen und Ideen, wann immer ich mit meiner Arbeit nicht weiterkam.

Gleicher Dank geht an meinen Betreuer Sigi Hapfelmeier für die Einführung in die wundersame Welt der Wissenschaft. In unseren unzähligen Diskussionen gewann ich ein Bild davon, was es heisst, wissenschaftlich zu denken und zu arbeiten, und seine grenzenlose Begeisterung für interessante Ideen und experimentelle Ansätze hat mich mehr als einmal angesteckt.

Ausserdem möchte ich meinen manchmal etwas unfreiwilligen Betreuern danken, will heissen, allen anderen Mitarbeitern der AG Hardt, die ich jederzeit mit meinen Fragen und vorläufigen Resultaten (und deren wildesten Interpretationen) behelligen durfte (nun, ob ich das durfte, weiss ich nicht so genau, sie haben sich jedenfalls nicht gewehrt). Bärbel und Kristin danke ich speziell für die vielen Plasmide, die ich deshalb nicht selbst konstruieren musste (und, wenn es doch mal soweit kam, für die Hilfe beim Klonieren), Manja für die geduldige Unterstützung bei Proteinaufreinigungen (Manja, wie geht's jetzt weiter? Manja, dauert's noch lange?), Markus für die Hilfe bei Zellkulturinfektionsexperimenten und Brit, Cosima, Gerald und Mrutyunjay für die vielen Diskussionen wissenschaftlicher wie auch unwissenschaftlicher Art. Gleiches gilt auch für die ganze Belegschaft des B-Floor am Institut für Mikrobiologie, insbesondere für meine Mitdiplomanden Claudio, Naja und Stefan.

Bei meiner Familie möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mich die ganze Zeit meines Studiums unterstützt haben und reges Interesse gezeigt haben an meiner Arbeit. Obwohl sie wahrscheinlich manchmal etwas mehr darüber erfahren haben, als sie eigentlich wissen wollten, hatte ich doch das Gefühl, dass sie meine Diplomarbeit für genauso wichtig hielten wie ich selbst.

Bei Christa schliesslich möchte ich mich besonders für die Momente bedanken, in denen die vorliegende Arbeit nicht das Wichtigste war...